

**Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas**

**Tesis Doctoral**

**Suero de Soja y sus Proteínas Aisladas.  
Estudio de Propiedades Térmicas, Superficiales y  
Crioprotección.**



**Tesista: Mag. Pablo Antonio Sobral**

**Director: Dr. Jorge Ricardo Wagner**

**Asesor: Dra. María Cristina Añón**

**Año 2015**

**Los resultados incluidos en esta tesis permitieron su divulgación en los siguientes medios:**

### **Revistas periódicas**

Ingrassia, R., Sobral, P. A., Risso, P. H., Palazolo, G. G y Wagner, J. R. Impact of isolation methods on chemical composition, structural properties, antitryptic activity, thermal behavior and solubility of soy proteins. Food Biophysics. En etapa de revisión.

Palazolo, G. G., Sobral, P. A. y Wagner, J. R. (2013). Dehydrated tofu whey as cryoprotectant in protein-stabilized oil-in-water emulsions. Lebensmittel, Wissenschaft und Technologie (LWT-Food Science and Technology), 50, 773-781.

Sobral, P. A., Palazolo, G. G. y Wagner, J. R. (2011). Effect of water content on thermal behavior of freeze-dried soy whey and their isolated proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59 (8), 3950-3956.

Palazolo, G. G.; Sobral, P. A.; Wagner, J. R. (2011). Freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions prepared with native and thermally denatured soybean isolates. Food Hydrocolloids, 2011, volume 25, Issue 3, ISSN 0268-005X, 398-409.

Sobral, P. A; Palazolo, G. G; Wagner, J. R. (2010). Thermal behavior of soy proteins fractions depending on their preparation methods, individual interactions and storage conditions Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58 (18), 10092-10100.

Sobral P. A. y Wagner, J. R. (2010). Estabilidad de emulsiones preparadas con proteínas de sueros de soja. Revista Anual INNOTEC (ISSN 1688-3691 / ISSN [en línea] 1510-6593), Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) Centro de Información Técnica (CITEIN).

Sobral, P. A. y Wagner, J. R. (2010). Capacidad emulsionante de sueros de soja. Revista Anual INNOTEC. Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) Centro de Información Técnica (CITEIN). 5, 63-65.

Sobral, P. A. y Wagner, J. R. (2009) Relationship between the composition and antitryptic activity of soy wheys and thermal behavior of their protein isolates. Información Tecnológica (ISSN 0718-0764) 20 (5), 65-73.

### **Proceedings en congresos nacionales e internacionales**

Ingrassia, R., Sobral, P., Risso, P., Palazolo, G. y Wagner, J. (2013). Propiedades estructurales y comportamiento superficial de proteínas de soja. Efecto de los agregados insolubles. XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL), Rosario, Santa Fe, Argentina, 23-25 de octubre 2013.

Palazolo, G. G., Wagner, J. R. y Sobral, P. A. (2010) Differential effect of glucose and sorbitol addition on freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions prepared with native and denatured soybean isolates. International Conference on Food Innovation (Foodinnova 2010). Proceeding n° 219 (formato electrónico), páginas 1-4.



Sobral, P. A. Palazolo, G. G. y Wagner, J. R (2009) Estabilidad de emulsiones preparadas con suero de soja y tofu y sus proteínas aisladas (Quiescent stability of o/w emulsions prepared with soy whey, tofu whey and their isolated proteins) Tomo 4, 407 páginas, ISBN: 978-987-24620-8-6. (Daniel Wunderlin y Rafael Borneo Editores) Ciencia y Tecnología de los Alimentos: Avances en Análisis Físicos, Químicos y Sensoriales. III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Córdoba, Argentina. (pp 339-347).

Sobral, P. A. y Wagner, J. R (2009) Estudio de la cristalización térmicamente inducida en suero de soja liofilizado (Study of thermally induced crystallization in lyophilized soybean whey) Tomo 2, 213 páginas, ISBN: 978-987-24620-7-9 (Rafael Borneo, Mirtha Nassetta y Nancy Passalacqua Editores) Ciencia y Tecnología de los Alimentos: Avances en Inocuidad y Microbiología. III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba, Argentina (pp 193-199)

Palazolo, Gonzalo. G., Sobral, Pablo. A. y Wagner, Jorge. R (2009) Efecto crioprotector del suero de soja liofilizado en emulsiones modelo aceite en agua. CD de Resúmenes y Trabajos completos del XII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL), ISBN 978-987-22165-3-5, área 7 (Análisis Físicos y Químicos de Alimentos, Ingredientes y Aditivos), trabajo N° 14, 6 hojas.

Sobral, Pablo. A. Palazolo, Gonzalo. G., y Wagner, Jorge. R. (2009) Efecto de la adición de suero deshidratado de tofu sobre la estabilidad durante el almacenamiento congelado de emulsiones o/w preparadas con aislados de soja. CD de Resúmenes y Trabajos completos del XII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL), ISBN 978-987-22165-3-5, área 7 (Análisis Físicos y Químicos de Alimentos, Ingredientes y Aditivos), trabajo N °36. 5 hojas.

Es verdad; pues reprimamos  
esta fiera condición  
esta furia, esta ambición,  
por si alguna vez soñamos:  
y si haremos, pues estamos  
en un mundo tan singular,  
que el vivir sólo es soñar;  
y la experiencia me enseña  
que el hombre que vive, sueña  
lo que es hasta despertar.  
Sueña el rey que es rey, y vive  
con este engaño mandando,  
disponiendo y gobernando;  
y este aplauso, que recibe  
prestado en el viento escribe;  
y en cenizas le convierte  
la muerte (¡desdicha fuerte!):  
¿que hay quien intente reinar,  
viendo que ha de despertar  
en el sueño de la muerte?  
Sueña el rico en su riqueza,  
que más cuidados le ofrece;  
sueña el pobre que padece  
su miseria y su pobreza:  
sueña el que afana y pretende,  
sueña el que agravia y ofende,  
y en el mundo en conclusión,  
todos sueñan lo que son,  
aunque ninguno lo entiende.  
Yo sueño que estoy aquí  
destas prisiones cargado,  
y soñé que en otro estado  
más lisonjero me vi.  
¿Qué es la vida? Un frenesí.  
¿Qué es la vida? Una ilusión,  
una sombra, una ficción,  
y el mayor bien es pequeño;  
que toda la vida es sueño,  
y los sueños, sueños son.

La vida es sueño (Calderón de la Barca)

## **AGRADECIMIENTOS**

Con todo mi afecto dedico este trabajo a mis padres Martha y Tito y a mi hermano Martín quienes estuvieron desde el comienzo de mi formación apoyándome siempre de manera incondicional y a mi esposa Mariela, con quien he compartido la etapa final de elaboración de esta tesis.

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 tesis.

A la Dra. María Cristina Añón, por su asesoría en la realización de esta tesis.

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

A la Universidad Nacional de La Plata por otorgarme una beca que permitió profundizar los trabajos sobre el sistema en estudio y la presentación de resultados en Congresos y a la Dra. Mabel Tomás por su codirección en dicha Beca, su constante apoyo y el aporte realizado para el desarrollo de este trabajo

A todos aquellos profesores y personal de apoyo quienes me asistieron en cuestiones concretas y cotidianas, con invalorable charlas y recomendaciones, material bibliográfico y de laboratorio.

Finalmente quiero agradecer a mis compañeros de cátedra, quienes me apoyaron, aconsejaron, permitiendo incluso el uso de las instalaciones pertenecientes a la cátedra.



<b>INDICE</b>	<b>Página</b>
Publicaciones.....	1
Agradecimientos.....	4
Índice.....	5
Abreviaturas de uso frecuente.....	8
 <b>INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 La soja. Antecedentes.....	10
1.2 Estructura y composición del grano de soja.....	13
1.3 Proteínas de la soja.....	14
1.3.1 Proteínas de reserva de soja.....	14
1.3.2 Proteínas de suero de soja.....	16
1.4 Compuestos no proteicos de soja.....	17
1.4.1 Oligosacáridos y polisacáridos.....	17
1.4.2 Compuestos con actividad biológica.....	18
1.5 Aprovechamiento de las proteínas de la soja.....	19
1.5.1 Harinas, concentrados y aislados proteicos de soja.....	19
1.5.2 Tofu y otros productos tradicionales de soja.....	22
1.6 Residuales líquidos. Sueros de soja y de tofu.....	22
1.7 Propiedades nutricionales de las proteínas de soja.....	23
1.8 Comportamiento térmico de las proteínas de soja.....	27
1.8.1 Proteínas de reserva.....	27
1.8.2 Proteína de suero de soja.....	29
1.9 Propiedades funcionales de las proteínas de soja.....	30
 <b>OBJETIVOS</b>	
Objetivo general.....	35
Objetivos particulares.....	35
 <b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
2.1 Preparación de aislado nativo y suero de soja.....	38
2.2 Obtención de sueros de soja y de tofu deshidratados.....	39
2.3 Obtención de suero de soja liofilizado calentado.....	39
2.4 Manipulación y almacenamiento de los sueros de soja y tofu deshidratados.....	41
2.5 Obtención de proteínas de sueros de soja y de suero de tofu.....	41
2.5.1 Precipitación por <i>salting-out</i> : (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 90%.....	42
2.5.2 Precipitación con solvente: acetona en frío.....	42
2.6 Obtención de proteínas a partir de sueros de soja modificados.....	44
2.6.1 Proteínas de SS modificados en su proceso de obtención.....	44
2.6.2 Proteínas aisladas a partir de SS liofilizados y liofilizados calentados.....	45
2.6.3 Molienda y secado secundario.....	45
2.7 Caracterización y determinación de la composición de sueros y proteínas aisladas.....	46
2.7.1 Contenido de extracto seco, densidad y lípidos.....	46
2.7.2 Contenido de minerales.....	46

2.7.3 Contenido de proteínas.....	48
2.7.4 Contenido de carbohidratos.....	50
2.7.5 Carbohidratos coprecipitados con las proteínas.....	50
2.8 Determinación de la actividad antitriptica.....	51
2.9 Determinación del comportamiento térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	52
2.9.1 Ensayos DSC sobre proteínas aisladas en solución.....	53
2.9.2 Ensayos DSC sobre proteínas y sueros deshidratados e hidratados con contenido acuoso <70%.....	54
2.9.3 Termogramas DSC modulados.....	55
2.10 Solubilidad de proteínas en agua destilada y en buffer fosfato.....	56
2.11 Electroforesis de proteínas aisladas.....	56
2.11.1 Reactivos utilizados.....	56
2.11.2 Muestras analizadas y preparación de las mismas.....	57
2.11.3 Condiciones de corrida.....	57
2.11.4 Revelado y análisis de los geles.....	57
2.12 Determinación de hidrofobicidad superficial y fluorescencia intrínseca.....	58
2.13 Medidas de tensión superficial.....	59
2.13.1 Determinación de la velocidad de adsorción.....	60
2.13.2 Determinación de la tensión de equilibrio.....	61
2.14 Determinación de propiedades emulsionantes.....	61
2.14.1. Preparación de emulsiones o/w.....	61
2.14.2 Caracterización de las emulsiones.....	61
2.15 Estudios de crioprotección de emulsiones congelada.....	70
2.15.1 Estudios a corto tiempo de almacenamiento congelado.....	71
2.15.2 Estudios a tiempos largos de almacenamiento congelado.....	73
2.16 Análisis estadístico.....	74

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3 Composición de sueros y proteínas aisladas**

3.1 Composición de sueros de soja y tofu, líquidos y secados.....	77
3.1.1 Carbohidratos coprecipitados en proteína de sueros deshidratados.....	80
3.2 Composición de proteínas aisladas de sueros líquidos y deshidratados de soja y tofu...	82
3.2.1 Carbohidratos coprecipitados en proteína de sueros líquidos.....	85
3.2.2 Carbohidratos en proteínas de sueros liofilizados: Efecto del tratamiento térmico.....	87
3.3 Actividad antitriptica en sueros de soja y tofu, líquidos y deshidratados.....	89
3.3.1 En suero de soja liofilizado: Efecto del tratamiento térmico.....	91
3.3.2 En proteínas aisladas.....	93
3.4 Electroforesis de proteínas aisladas nativas no tratadas térmicamente.....	94
3.4.1 Electroforesis de proteínas aisladas y tratadas térmicamente.....	97
3.5 Conclusiones parciales.....	99

### **4. Comportamiento térmico de sueros y de sus proteínas aisladas**

4.1 Comportamiento térmico de suero de soja liofilizado.....	102
4.1.1 Termograma de SSL en condiciones anhidras.....	102
4.1.2 Termogramas de SSL con diferentes contenidos de humedad.....	104
4.2 Comportamiento térmico de proteínas de suero de soja.....	108
4.2.1 Comparación del comportamiento térmico de proteínas de suero de soja con un aislado nativo de soja.....	108

4.2.2 Efectos de la preparación y tratamientos sobre el comportamiento térmico de proteínas aisladas de suero de soja.....	110
4.2.3 Comportamiento térmico de las proteínas del suero de tofu.....	122
4.3 Comportamiento térmico de mezclas ASN/PSS.....	123
4.3.1 Con PSS no tratada térmicamente.....	123
4.3.2 Con PSS tratada térmicamente.....	127
4.4 DSC de proteínas de suero de soja con diferentes contenidos de humedad.....	130
4.5 Comportamiento térmico comparativo entre PSS <sub>ac-4,5</sub> y SSL.....	136
4.6 Conclusiones parciales.....	140
<b>5 Solubilidad, propiedades fisicoquímicas y comportamiento superficial de proteínas aisladas</b>	
5.1 Solubilidad en agua de proteínas en suero de soja y tofu líquidos y secados.....	143
5.2 Solubilidad en agua de proteínas aisladas de sueros líquidos.....	144
5.3 Solubilidad en agua de proteínas en suero de soja liofilizado calentado.....	146
5.4 Solubilidad en agua de proteínas aisladas desde suero de soja liofilizado calentado.....	147
5.5 Solubilidad en agua de proteínas aisladas: Efecto del almacenamiento.....	149
5.6 Solubilidad proteica en buffer. Efecto del calentamiento.....	153
5.7 Propiedades fisicoquímicas de proteínas totales y sus fracciones solubles, con y sin calentamiento previo.....	157
5.7.1 Fluorescencia intrínseca.....	157
5.7.2 Hidrofobicidad superficial.....	160
5.8 Comportamiento superficial.....	163
5.9 Conclusiones parciales.....	168
<b>6 Propiedades emulsionantes de sueros deshidratados y proteínas aisladas</b>	
6.1 Emulsiones preparadas con sueros deshidratados.....	172
6.2 Emulsiones preparadas con proteínas aisladas.....	183
6.2.1 Comparación entre proteínas aisladas y sueros deshidratados.....	190
6.3 Emulsiones preparadas con suero de soja deshidratado y calentado.....	193
6.4 Emulsiones preparadas con proteínas aisladas de suero de soja deshidratado y calentado.....	197
6.5 Emulsiones preparadas con proteínas aisladas y luego desnaturalizadas en dispersión acuosa.....	200
6.6 Conclusiones parciales.....	205
<b>7 Efecto crioprotector de sueros de soja y tofu sobre emulsiones congeladas</b>	
7.1 Cinética de congelamiento.....	208
7.2 Estudios de crioprotección a tiempos cortos de almacenamiento congelado.....	210
7.2.1 Ensayos con emulsiones de caseinato de sodio.....	210
7.2.2 Ensayos con emulsiones de aislado nativo de soja.....	220
7.3 Estudios de crioprotección a tiempos largos de almacenamiento congelado.....	232
7.4 Conclusiones parciales.....	247
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>250</b>
<b>9. REFERENCIAS.....</b>	<b>254</b>



## Abreviaturas más frecuentemente usadas

$\Delta H$ : Entalpía total de desnaturalización

$\gamma$ : Tensión superficial

$\gamma_i$ : Tensión interfacial

$\phi_m$ : Fracción másica de fase dispersa

AA: Actividad antitriptica

AAR%: Actividad antitriptica relativa porcentual

ANS: 1-anilinoftaleno-8-sulfonato de amonio

ASN: Aislado de soja nativo

AS%: Aceite separado porcentual

BS%: Backscattering porcentual

CS: Caseinato de sodio

C%: Coalescencia porcentual

DSC: Calorimetría diferencial de barrido

DTP: Distribución de tamaño de partícula

$D_{3,2}$ : Diámetro promedio de Sauter

$D_{4,3}$ : Diámetro promedio de De Brouker

FC%: Fase crema porcentual

FI: Fluorescencia intrínseca

GF%: Grado de floculación porcentual

IC%: Índice de coalescencia porcentual

IF%: Índice de floculación porcentual

If: Intensidad de Fluorescencia

ITBB: Inhibidor de la tripsina de Bowman-Birk

K: Constante cinética de separación gravitacional

ITK: Inhibidor de la tripsina de Kunitz

L: Lectina

PSS: Proteínas de suero de soja

PSSLC: Proteínas de suero de soja liofilizado y calentado

PST: Proteínas de suero de tofu

S%: Solubilidad porcentual

SS: Suero de soja

SSL: Suero de soja liofilizado

SSLC: Suero de soja liofilizado y calentado

SSST: Suero de soja secado térmicamente

ST: Suero de tofu

STL: Suero de tofu liofilizado

STST: Suero de tofu secado térmicamente

Te: Tensión de equilibrio

Vd: Velocidad de difusión

# **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 La soja. Antecedentes**

La soja (*Glycine max*) es una especie de la familia de las leguminosas y como tal, los granos se desarrollan dentro de vainas, que constituyen el fruto típico. Se trata de una planta anual que se cultiva durante la estación cálida. Cada vaina puede contener entre una y cuatro semillas y su adaptación a climas diversos y las pocas enfermedades que la atacan la convierten en una forma de cultivo muy rentable.

El cultivo de la soja comenzó en oriente hace miles de años. Los emperadores chinos la consideraban una de las cinco semillas sagradas, junto con el arroz, el trigo, la cebada y el mijo, debido a sus propiedades nutritivas y de prevenir enfermedades (Díaz Cruz, 2006).

Se cree que el factor principal del desarrollo de la soja en los países orientales fue la escasez de proteínas de alta calidad para la alimentación. El cultivo se centraba fundamentalmente en el noroeste de China y fue introducido por los monjes budistas a Japón en el siglo VII donde muy pronto se convirtió en un cultivo popular. En 1712, el botánico Engelbert Kaemfere discutió en detalle varios alimentos elaborados en Japón a partir de este poroto y que, vale aclarar, se siguen consumiendo en este país y en otros de oriente con algunas variantes aportadas por la tecnología actual.

Las primeras referencias de la soja que se tienen en Europa se remontan al siglo XVII, donde los misioneros introducen las habas de soja para su cultivo, sin gran éxito, y los marinos holandeses y portugueses la traen como novedad. Una recopilación llevada a cabo por Cuniberti y col. (2004), explica que la introducción de este cultivo en EEUU se produjo en 1765, donde años después se realizaron cultivos a pequeña escala alcanzando popularidad a comienzos del siglo XX, para emplearse principalmente como oleaginosa y para el consumo animal. Más recientemente se comenzó a valorar la soja por sus propiedades nutritivas y sus potenciales efectos benéficos sobre la salud. En dicho país, el consumo de la soja como alimento humano se produjo, especialmente entre los consumidores “sofisticados” y que frecuentemente eran vegetarianos, preocupados por la alimentación saludable, variada y orgánica. Si se tiene en cuenta las proteínas de soja empleadas en fórmulas para lactantes desde hace más de 40 años (*International Formula Council, Standby Statement, 2002*), el consumo es aún mayor.

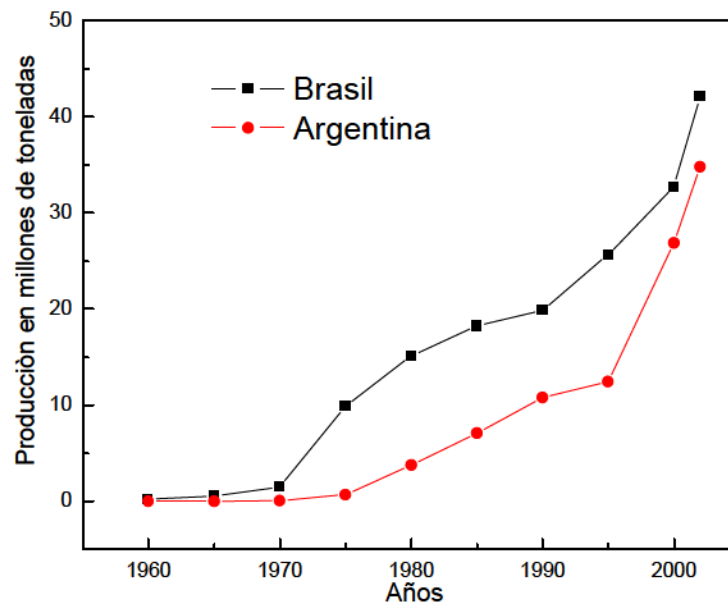
Posteriormente a su llegada a EEUU, la soja fue introducida en Brasil y Argentina. La llegada de esta leguminosa a Brasil se remonta a fines del siglo XIX. En 1882 se introdujeron en el estado de Bahía granos de soja provenientes de Estados Unidos,



iniciándose una primera etapa de experimentación que culminó fracasando y desalentando el cultivo debido a sus dificultades de adaptación (Dougnac, 2010).

Un par de décadas más tarde, la llegada de inmigrantes japoneses impulsaría a que la producción de soja se instale lentamente en San Pablo, donde encontró condiciones favorables para su expansión. Hasta 1940 el cultivo de soja avanzó muy lentamente como producto orientado a la subsistencia de pequeños campesinos. Más tarde, el gobierno impulsó la investigación, permitiendo que sea adoptado por productores familiares en pequeñas extensiones intercalado con otros cultivos de subsistencia tales como el maíz.

A partir de 1970, en respuesta a una creciente demanda internacional acompañada de buenos precios, se produjo el primer salto (Figura 1) que haría de la soja uno de los principales cultivos del Brasil. De las 532.000 toneladas en 1965, se superó los 10 millones en 1975.



**Figura 1:** Evolución en la producción de soja para Argentina y Brasil. Fuentes: Bolsa de Cereales y Ministerio de Agricultura y Ganadería (Argentina) y FAO. Estadísticas agrícolas y agroalimentarias. Productos principales por país. En [www.fao.org](http://www.fao.org) (Brasil).

En los años 90, la creciente alza de los precios internacionales del producto y el favorable aumento de precios relativos, impulsarían en algunas regiones el reemplazo de viejos cultivos por esta oleaginosa. La creciente devaluación del peso brasileño, más la falta de retenciones a las exportaciones agrícolas, crearon condiciones económicas favorables para el negocio sojero que se orientó en gran medida hacia el mercado externo. En 1999, el crecimiento de la producción de soja convirtió a Brasil en el segundo productor mundial,

## *Introducción*

ocupando el 45% de toda su superficie cultivada y contribuyendo con el 18% del valor bruto de la producción agropecuaria del país y el 10% de las exportaciones agrícolas.

En nuestro país la llegada de la soja fue muy posterior, iniciándose los primeros cultivos en 1909 en la Estación Experimental Agronómica de Córdoba, experiencia que continuó diez años más y cuyos resultados fueron publicados posteriormente por su director, Tonnelier. Dicha publicación fue un temprano informe acerca de las condiciones, factibilidad y posibilidades de desarrollo de una producción que se consideraba sobre todo apta para cubrir las necesidades crecientes de forraje (Tonnelier, 1913).

En 1924 se importaron algunas variedades de soja que fueron distribuidas en diferentes regiones para determinar su grado de adaptación en las diversas zonas del país. En 1932, la Refinería Río Segundo, una empresa aceitera instalada en la provincia de Córdoba, proveyó de semillas a algunos productores, produciéndose una siembra de 6.000 hectáreas a efectos de abastecer la demanda generada por la fábrica. Esta iniciativa fue abandonada a mediados de los años 40 por las dificultades que encontraba el cultivo, sobre todo a causa del complicado manejo debido a su debilidad frente a las malezas y las consiguientes tareas de cuidado que este requería. La promoción e investigación del cultivo por parte de empresas aceiteras continuó también durante los años 50, con resultados bastante limitados.

Finalmente, en 1962 se realizó la primera exportación argentina de soja de 6.000 toneladas. La campaña 61-62 mostró el cambio importante en la producción de la oleaginosa, ya que la superficie cultivada se extendió más de diez veces en relación a la campaña anterior llegando a totalizar algo más de 10.000 hectáreas.

Como se observa en la Figura 1, la producción de soja en Argentina se incrementó drásticamente a partir de 1970, lo que representa un crecimiento de 440 veces desde las 59.000 toneladas (campaña 1970/1) a las 26 millones de toneladas alcanzadas en 2000/1. La alta capacidad de adaptación de este cultivo a diversos suelos y climas de la Argentina, así como las políticas económicas implementadas de desplazamiento de otros cultivos, la aplicación de la técnica de “siembra directa” y otras actividades tales como la ganadera permitieron extender el área dedicada al cultivo de esta leguminosa y aumentar su rendimiento. Actualmente es un cultivo muy extendido en nuestro país que se extiende desde los 23° a los 39° de latitud sur (Cuniberti y col., 2004).

La producción de soja ha seguido creciendo en nuestro país, alcanzando las 40 millones de toneladas en la campaña 2005/6, con un pico de 52,7 millones de toneladas para la campaña 2009/10. A finales del 2014 el Departamento de Agricultura de los EEUU

informó que la producción Argentina alcanzó las 55,0 millones de toneladas para la campaña 2014/2015 quedando en tercer lugar por debajo de EEUU y Brasil con 107,7 y 94,0 millones de toneladas respectivamente (USDA, 2014).

Respecto al consumo, si se compara con países de producción equivalente como EEUU, Brasil y China, en nuestro país no está tan difundido, ya que histórica y culturalmente las principales proteínas consumidas han provenido de fuentes animales. Aunque otras leguminosas (como porotos blancos, lentejas, garbanzos, etc.) son consumidas en platos tradicionales desde hace mucho tiempo en varias provincias, no ocurre lo mismo con la soja. Recién a partir de la década del 70 la soja comenzó a ser consumida en alimentos como bebidas y símil productos cárneos pero solo en un reducido porcentaje de la población, siendo la mayor parte de la semilla producida destinada a la exportación como grano no procesado o en forma de subproductos tales como aceite o harina (Casale, 2004).

### 1.2 Estructura y composición del grano de soja

El poroto de soja está constituido en un 90% por unas estructuras denominadas cotiledones, un 8% de envolturas y un 2% de hipocotilo o germen. En la Tabla 1 se muestra la composición química de las distintas partes del grano. Los datos revelan que el componente más abundante en los porotos son las proteínas, seguida por los glúcidos, lípidos y minerales, en ese orden.

**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).

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

La parte más rica en proteínas y lípidos son los cotiledones, motivo por el cual se emplean generalmente los granos descascarados y desgerminados para aislar estos componentes. Antes de analizar algunas variantes en el procesamiento de los granos de soja y los

principales subproductos obtenidos analizaremos los macrocomponentes hallados en la soja.

### **1.3 Proteínas de la soja**

En base a diferencias estructurales, a su solubilidad a distintos pH, a su función y actividades biológicas, las proteínas de la soja se dividen en dos grupos, proteínas de reserva y proteínas biológicamente activas o de suero de soja.

#### **1.3.1 Proteínas de reserva de soja**

Cheftel y col. (1989) informaron que tras la separación de componentes insolubles en agua (fibra) del poroto de soja se obtiene un extracto que contiene las proteínas de soja, 75% de las cuales son las denominadas globulinas de reserva, mientras que el 25% restante corresponden a las proteínas biológicamente activas. Lah y Cheryan (1980) analizaron la solubilidad global de las proteínas del grano de soja triturado o entero, en función del pH y hallaron que presentan una mínima solubilidad en el rango de pH 3,70-5,20 lo que está situado en torno de su pH isoelectrico (pI 4,2-4,6). Observaron el característico aumento de solubilidad en la medida que nos alejamos de estos valores, hacia la región ácida o hacia la alcalina. En agua o en soluciones salinas con baja fuerza iónica (<0,1), tanto a pH 2,0 como a pH 8,0 se solubiliza un 85% de las proteínas. En esta última condición, un agregado adicional de álcali aumenta la extracción de proteína en un 5-10% alcanzándose un porcentaje de extracción del 95% a pH 11,0. Un perfil de solubilidad similar se obtiene desde una torta desgrasada de soja (resultante de una extracción con hexano), si la misma fue preparada en condiciones suaves de molienda, sin calentamiento excesivo y realizando la eliminación del solvente a baja temperatura.

Estas características de solubilidad en función del pH se atribuyen fundamentalmente a las globulinas de reserva. Estas proteínas son insolubles en su pH isoelectrico pero pueden ser solubilizadas parcialmente en estas condiciones por agregado de sales como el NaCl, hasta un valor de fuerza iónica de 0,5. En todos los casos el proceso de extracción de las proteínas de soja requiere, para lograr una máxima eficiencia de extracción, minimizar su desnaturalización.



## ***Introducción***

En una recopilación reciente realizada por Miroljub y col. (2004) se indica que las proteínas de almacenamiento de la soja pueden clasificarse en 4 fracciones de acuerdo a sus propiedades de sedimentación. Estas fracciones son la 3S, 7S, 11S y 15S que corresponden al 8, 35, 52 y 5% respectivamente del contenido total de proteínas. Las principales proteínas de almacenamiento son la glicinina (11S) y la  $\beta$ -conglucina que representan el 70% de la proteína soluble. La relación entre las globulinas 11S y 7S varía ampliamente entre las leguminosas, y se encuentra en el rango entre 0,5 y 1,7 para el caso de la soja (Ruíz-Henestrosa y col., 2007).

La glicinina tienen una estructura cuaternaria compacta, estabilizada por puentes disulfuro, así como por interacciones hidrofóbicas y electroestáticas. Según Cheftel (1989), está compuesta por dos grupos distintos de subunidades, los de naturaleza ácida con un peso molecular (PM) entre 31-38 kDa y los de naturaleza básica con un PM entre 18-20 kDa. Los polipéptidos ácidos y básicos están unidos entre sí por puentes disulfuros formando seis subunidades A-S-S-B (Miroljub y col., 2004), resultando una estructura hexamérica con un peso molecular aproximado de 360 kDa (Wagner y Guéguen, 1999a,b). Por su parte, Marcone y col. (1998) y Lakemond y col. (2000) proponen un modelo estructural de la glicinina con las subunidades A-B dispuestas en dos hexágonos idénticos que se superponen, asegurando una conformación globular rígida. En dicha estructura cada polipéptido ácido está rodeado de tres polipéptidos básicos y recíprocamente, favoreciéndose los intercambios de uniones disulfuro. Dependiendo de la fuerza iónica y el pH, la glicinina (11S) se disocia en la forma 7S, que es un trímero de subunidades A-S-S-B y en la forma 3S, que es un monómero A-B (Martin y col., 2002). También puede tener lugar una asociación en la forma 15S (un dímero de 11S). Los pesos moleculares promedio de las formas 3S, 7S, 11S y 15S son aproximadamente 50, 175, 350 y 780 kDa, respectivamente (Cheftel y col., 1989).

Medidas físicas parecen indicar que en estado nativo la glicinina así como la  $\beta$ -conglucina solo contiene un 5% de estructura de  $\alpha$ -hélice, estando caracterizada su estructura secundaria fundamentalmente por hojas  $\beta$ -plegadas (35% de la molécula) y un 60% por grupos compactos con estructura de *random coil*.

La globulina 7S,  $\beta$ -conglucina, tiene un PM en el rango 150-180 kDa, y es una glicoproteína que contiene a los carbohidratos unidos a los residuos de ácido aspártico del extremo N-terminal de la molécula. La relación hallada es de 38 manosas y 12 residuos de glucosaminas por molécula de proteína (Miroljub y col., 2004).



Existen al menos 7 formas oligoméricas de la  $\beta$ -conglucina, las cuales están constituidas por la combinación de tres subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$ , y  $\beta$ , que interaccionan para producir siete isómeros ( $B_0$ - $B_6$ ). Los PM de las subunidades son 72, 68 y 52 kDa respectivamente (Miroljub y col., 2004).

### **1.3.2 Proteínas de suero de soja**

Hay una serie de proteínas que permanecen solubles en el suero isoelectrico generado en la precipitación isoelectrica de las globulinas de reserva, conocido como suero de soja (SS), por eso estas proteínas son las denominadas proteínas de suero de soja (PSS). Entre los componentes proteicos con actividad biológica que componen las PSS se encuentran: factores antitripticos, hemoaglutininas, lipooxigenasa,  $\beta$ -amilasa, citocromo C y ureasa.

Las leguminosas en general contienen factores antitripticos que reducen el aprovechamiento digestivo de las proteínas; en la soja hasta el momento se han identificados dos factores antitripticos de naturaleza proteica. El más abundante y responsable del 90 al 95% de la actividad inhibitoria es el factor inhibidor de la tripsina de Kunitz (ITK), mientras que en menor proporción se encuentra el factor inhibidor de la tripsina de Bowman-Birk (ITBB).

El ITK tiene una masa molecular de 20,1 kDa, y su actividad inhibitoria de la tripsina y quimiotripsina intestinal no se modifica en el rango de pH entre 1 y 14 o temperaturas inferiores a 80°C, pero puede ser inactivado por tratamientos hidrotérmicos adecuados. Cuando está inactivo, exhibe propiedades benéficas para la salud que incluyen el incremento de la producción de óxido nítrico por los macrófagos, así como una disminución en las proliferaciones de células cancerosas de seno o hígado (Lin y Ng, 2008).

El ITBB de la soja tiene un PM de 8 kDa, esta formado por 71 aminoácidos con sitios capaces de inhibir la tripsina y la quimiotripsina (Odani e Ikenaka, 1973). Es capaz de resistir las temperaturas de cocción y el pH del estómago humano debido al alto número de puentes disulfuro en su estructura (Birk, 1987). El ITBB tiene propiedades estimulantes del sistema inmune (Harms-Ringdahl y col., 1979) y ha demostrado propiedades anticancerígenas (Yavelow y col., 1985, Kennedy, 1993). Estudios posteriores (Kennedy, 1998) señalaron que resulta efectivo en la prevención y supresión de carcinomas inducidos químicamente o por radiación o *in vitro* mientras que *in vivo* es capaz de inhibir el cáncer

de colon, esófago, hígado, pulmón y cavidad oral (Losso, 2008). El ITBB junto con péptidos con propiedades fisiológicas como el lunasin han sido detalladamente estudiados llegando incluso a determinarse su estructura molecular (Henández-Ledesma y col., 2009). Tanto ITK como ITBB reducen considerablemente la calidad nutricional de las proteínas de soja por lo cual tienen que ser adecuadamente inactivados.

Las hemaglutininas, también conocidas como lectinas, son glicoproteínas de PM 110 kDa y un contenido de 4,5% de D-mannosa y 1,5% de N-acetyl-D-glucosamina. Representan del 1,0 al 3,0% de las proteínas presentes en la harina de soja, y son llamadas así por su capacidad de formar complejos con compuestos glucídicos en la superficie de los glóbulos rojos, lo que produce su aglutinación *in vitro*. Los granos de soja contienen varios tipos de lectinas con diferentes niveles de actividad (Kakade y col., 1972). Todas las lectinas son inactivadas por calor y por acción de proteasas como la pepsina. Turner y Liener (1975) demostraron que las hemaglutininas presentes en la soja tienen una baja repercusión sobre el valor nutricional de las proteínas de soja.

Las lipoxigenasas 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 de 5,68 y fácilmente inactivadas por tratamiento térmico (Iwabuchi y Yamauchi., 1987).

Por último, la ureasa es una enzima que puede ser usada como indicador de proceso de inactivación. La inactivación de la ureasa presente en el poroto de soja activo es de fácil cuantificación y se utiliza como indicador de la inactivación de los inhibidores de proteasas durante el tratamiento térmico de las tortas destinadas a la alimentación animal.

## **1.4 Compuestos no proteicos de soja**

### **1.4.1 Oligosacáridos y polisacáridos**

La Tabla 2 muestra la composición típica de carbohidratos hallada en la harina de soja. Más de la mitad de los carbohidratos son insolubles en agua fría y están constituidos mayoritariamente por polisacáridos como la hemicelulosa, celulosa y pectina. Los estudios

de Rackis (1981), mostraron que los oligosacáridos son atacados por las bacterias en el tracto digestivo generando cantidades extras de gas lo que produce las flatulencias típicamente asociadas al consumo de la soja.

Los oligosacáridos que más contribuyen a la flatulencia son verbascosa, estaquiosa y rafinosa. Debido a los malestares como calambres, nauseas, dolor abdominal, diarrea y aumento del peristaltismo intestinal, generalmente se recomienda la eliminación o reducción de los oligosacáridos en los productos de soja. Tales procesos pueden incluir una etapa de extracción del grano o de la harina de soja con agua caliente o con mezclas etanol-agua, proceso clásico de obtención de concentrados, o tratamiento tales como la precipitación isoeléctrica de las proteínas de reserva a partir de extractos, para obtener aislados de soja.

**Tabla 2:** Composición típica de los carbohidratos presentes tanto en escamas como en harina de soja, expresado en base seca (Pearson, 1983; Waggle y Kolar, 1979).

<b>Carbohidratos</b>	<b>%</b>
<b>Solubles, total</b>	<b>17</b>
Sacarosa	5,7
Rafinosa	4,1
Estaquiosa	4,5
Verbascosa y hexosas	Trazas
<b>Insolubles, total</b>	<b>21</b>

Sin embargo, Tomosatsu (1994) halló que el consumo moderado y controlado 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.

### 1.4.2 Compuestos con actividad biológica

Unos de los compuestos bioactivos no proteicos más importantes en la soja son las isoflavonas. Son una subclase de flavonoides que se encuentran en forma limitada en el reino vegetal, siendo la soja la única fuente alimentaria natural accesible en donde se encuentran. En el poroto las isoflavonas principales son la genisteína (4', 5, 7-

trihidroxisoflavona) y la daidzeína (4', 7-dihidroxisoflavona) y sus respectivos  $\beta$ -glucósidos, genistina y daidzina. Debido a su similitud química con los estrógenos son considerados fitoestrógenos. Dado que los niveles de isoflavonas en el suero de las personas que consumen alimentos de soja resulta ser 1000 veces mayor que la de los estrógenos endógenos, las isoflavonas tienen una potencial capacidad de tener acción estrogénica, muy estudiada en ratones y probada en humanos (Divi y col., 1997; Chang y Doerge, 2000).

Otro factor antinutricional no proteico presente en soja es el ácido fítico (mio-inositol hexafosfatado). Representa el 1,5% del peso total del cotiledón y un gramo de soja contiene aproximadamente 4 mg de fitato (Martínez Domínguez y col., 2002), siendo una fuente importante de fósforo que es desaprovechada por su escasa digestibilidad. Jaffe (1981) halló que el ácido fítico reacciona a pH ácido con las proteínas formando complejos insolubles luego de la neutralización. Durante el procesamiento pueden formarse complejos proteínas-ácido fítico-minerales que disminuyen la biodisponibilidad de los minerales. El mineral más afectado por los fitatos es el Zn, seguido por el Fe.

### **1.5 Aprovechamiento de las proteínas de la soja**

Pese a que la producción de proteína es suficiente para alimentar a la población mundial, la malnutrición prevalece en muchas partes del mundo. Esto se debe a que el 70% de las proteínas producidas son de origen vegetal, especialmente de leguminosas, las cuales son baratas y abundantes. Sin embargo, dichas proteínas no son utilizadas en la mayoría de los casos en la alimentación humana en forma directa sino que se emplean para producir proteínas animales (Damodaran, 1989).

#### **1.5.1 Harinas, concentrados y aislados proteicos de soja**

Aproximadamente el 95% de la totalidad de la soja se procesa para producir harina desgrasada y aceite, generando el 21% del aceite y el 61% de las proteínas usadas a nivel mundial. Hay múltiples variantes para procesar los granos. En nuestro país son acondicionados ajustando la humedad al 10%, realizando luego un proceso de limpieza y selección, a continuación son quebrados, separando las cáscaras por aspiración, calentados y laminados hasta un espesor de 0,30 mm. En algunas plantas se emplea un extrusor



## Introducción

sometiendo las láminas al vapor y a una matriz perforada, separando el aceite con hexano y obteniendo la harina que es tostada para desactivar enzimas e inhibidores. La concentración proteica en las harinas de soja ronda entre el 42 y el 48%, pudiendo ser desgrasadas, total o parcialmente (bajas o altas en grasas) o lecitinadas, en las que se les agrega un 15% de lecitina para mejorar sus propiedades emulsionantes (Casale, 2004).

Endres (2001) recopiló información de los principales productos proteicos derivados de la soja. A partir del grano con un contenido de proteína próximo al 40% (Tabla 1), si se remueven las cubiertas y totalmente el aceite por extracción con hexano se obtiene como producto una harina con cerca de un 50% de proteína. Conceptualmente, la harina entera son los porotos de soja molidos después de haberles removido las cubiertas, mientras que la harina parcialmente desgrasada y texturizada son los granos de soja en los que se han removido las cubiertas, parte del aceite y se ha molido y pasado por un extrusor para darles estructura, de manera similar a como se hace con las fibras y poder ser usadas como ingredientes alimentarios. Excluyendo la harina entera y la harina parcialmente desgrasada y texturizada, los principales productos obtenidos desde la soja caen en tres grandes grupos basados en el contenido de proteína entre el 40 al 90%. Dichos grupos son: harinas desgrasadas, concentrados y aislados.

Según Casale (2004) por cada 100 kg de poroto de soja se obtienen 65,0 kg de harina desgrasada (50% de proteínas) de la que se pueden obtener finalmente 33,0 kg de concentrado proteico (70% proteína) o 19,6 kg de aislado proteico (90% proteína). La composición de estos productos se detalla en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Composición porcentual de harina desgrasada de soja, concentrado de soja y aislado de soja típicos expresada en base seca. El contenido de humedad de estos productos se encuentra en los rangos 6-8%, 4-6% y 4-6%, respectivamente.

Constituyente	Harina desgrasada	Concentrado	Aislado
Proteína (N x 6,25)	56,0-59,0	65,0-72,0	90,0-92,0
Materia grasa (éter petróleo)	0,5-1,0	0,5-1,0	0,5-1,0
Fibra cruda	2,7-3,8	3,5-5,0	0,1-0,2
Fibra dietaria soluble	2,1-2,2	2,1-5,9	< 0,2
Fibra dietaria insoluble	17,0-17,6	13,5-20,2	< 0,2
Cenizas	5,4-6,5	4,0-6,5	4,0-5,0
Hidratos de carbono totales (por diferencia)	32,0-34,0	20,0-22,0	3,0-4,0

## *Introducción*

Los concentrados son obtenidos a partir de harina desgrasada, removiendo la mayor parte de los componentes no proteicos solubles en agua (mayoritariamente hidratos de carbono y sales). Contienen al menos 65% de proteína (Nx6,25) en base seca.

Hay tres variantes para obtener concentrados, que son: lixiviación con agua ácida (pH  $\approx$  4,5), extracción con mezclas agua-alcohol (60-90%) o desnaturalización-insolubilización de las proteínas en condiciones húmedas antes de la extracción acuosa.

Los aislados son los productos más refinados comercialmente disponibles, con un contenido de nitrógeno  $>$  90% (Nx6,25) en base seca. La metodología básica para obtener aislados contempla los siguientes pasos: a) extracción de harina desgrasada activa con agua destilada ajustada a pH 8,0 con NaOH; b) centrifugación para eliminar los componentes insolubles (mayoritariamente fibras); c) ajuste del extracto a pH 4,5 con HCl para producir la precipitación isoelectrica de las proteínas de reserva; d) separación de las globulinas insolubles mediante centrifugación; e) lavado del precipitado con agua destilada; f) solubilización a pH neutro o ligeramente alcalino y g) secado (por spray a nivel industrial o por liofilización a nivel de laboratorio).

Muchos autores estudiaron el efecto de cambios en las condiciones de preparación de los aislados de soja sobre sus propiedades estructurales y funcionales. Entre ellos, Petruccelli y Añón (1995b) analizaron el efecto de la temperatura (50-100°C), la concentración de proteína (7-56 mg/ml), el pH (6-10) y la presencia de agentes reductores (0,01% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> a distintas temperaturas y tiempos).

Wagner y col. (2000) analizaron variantes tales como: relación harina: agua, tiempo de extracción, condiciones de las diferentes centrifugaciones, la opción de lavar o no las globulinas precipitadas con agua destilada, así como el efecto del pH de solubilización y la concentración antes de liofilizar. Los aislados de mayor solubilidad en agua y que contienen las globulinas 7S y 11S menos desnaturalizadas fueron los obtenidos con una extracción de 2 hs. a pH 8,0 empleando una relación harina: agua de 1: 10 p/p, lavando el precipitado con agua destilada, solubilizando a pH 8,0 y liofilizando soluciones conteniendo 4-6% de globulinas.

El sobrenadante isoelectrico obtenido del paso d) es lo que denominamos suero de soja (SS). En este suero se encuentra la mayoría de las proteínas biológicamente activas a las que denominamos PSS y que van a ser estudiadas en el presente trabajo.

### **1.5.2 Tofu y otros productos tradicionales de soja**

Además del aceite, las harinas, los concentrados y los aislados que normalmente se obtienen de la soja pueden obtenerse otros productos, muchos de ellos derivados de la gastronomía oriental que pueden o no incluir un proceso de fermentación.

Algunos de estos productos especiales son *tempeh* (poroto cocinado fermentado con *Rhizopus oryzae*), salsa de soja (bebida fermentada a base de soja y cereales, usualmente trigo), miso (pasta de porotos de soja cocinados y fermentados con *Aspergillus oryzae*), leche de soja (bebida obtenida por extracción acuosa del poroto entero, que contiene tanto proteínas de reserva como de suero) y tofu, del cual se va a hablar más detalladamente.

El tofu es un producto tradicional de la cocina oriental muy extendido en nuestro país, cuyo suero remanente será analizado en este trabajo.

Los procesos para la obtención del tofu, que se puede considerar un queso de leche de soja, son tan variados como los tipos de tofu hallados en el mercado. Un proceso típico comienza con la limpieza y remojo de los porotos (8-10 h), seguida de una etapa de molienda-extracción en exceso de agua a 80-90°C y luego de una etapa de cocción.

El objetivo del primer tratamiento térmico es la inactivación de la lipoxigenasa y simultáneamente la obtención de la dispersión-emulsión proteína-aceite (pH  $\approx$  6,5; 9,0% sólidos) conocida como leche de soja.

La etapa de cocción se realiza para coagular las proteínas de reserva y para la eliminación de productos volátiles e inactivación de los factores antitripticos y lectinas (Liu, 1999 y Valentas y col., 1991).

La coagulación a partir de la leche de soja se realiza con previo agregado de sales de calcio y/o magnesio (2-4% del peso original, 10-30 min., entre 70 y 85°C) para formar la estructura tipo gel constituida por proteínas de reserva coaguladas y fibras, denominada tofu. Operaciones de prensado o filtrado permiten la expulsión del suero de tofu (ST).

### **1.6 Residuales líquidos. Sueros de soja y de tofu**

Tanto el SS como ST, son residuales líquidos que representan una contaminación o carga orgánica indeseable. Contienen proteínas y otros componentes bioactivos que pueden ser utilizados o recuperados, cuando en general son desechados como efluentes.

Solo en los últimos 10 años comenzaron a realizarse estudios para su aprovechamiento, principalmente en países productores de aislados o de tofu y que generan grandes volúmenes de estos sueros.

Los componentes mayoritarios de estos efluentes son los hidratos de carbono solubles del grano de soja (mono, di- y oligosacáridos) y las proteínas no precipitables en las condiciones del proceso que son mayormente las biológicamente activas.

En el caso del suero de tofu (ST), las proteínas están inactivadas debido a los tratamientos térmicos aplicados que logran la desnaturalización parcial o total. En cuanto a los azúcares, Espinosa-Martos y col. (2006) y Espinosa-Martos y Rúperez (2006) hallaron que la sacarosa es el más abundante en el ST, en tanto que los oligosacáridos estaquiosa y rafinosa le siguen en abundancia. Estos autores hallaron niveles cuantificables de las isoflavonas genisteína y daidzeína. La presencia de sales en el ST fue evaluada mediante la determinación de cenizas siendo los minerales predominantes las sales de calcio y/o magnesio adicionadas para la coagulación proteica (Liu, 1999). En nuestros estudios (Sobral y Wagner, 2009) se determinó que el contenido de proteínas y carbohidratos del SS fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que del ST. El menor contenido proteico hallado en el ST fue atribuido al menor contenido de sólidos en el suero industrial, a la precipitación más eficiente de las globulinas por acción del calcio y a la mayor retención de proteínas durante la formación de la red proteica durante la formación del tofu.

El ST contiene alrededor del 9% de las proteínas de la soja y cerca del 70% de los minerales agregados para realizar la coagulación (Ben Ounis y col., 2008). Las proteínas de suero de tofu (PST), al igual que las PSS fueron mucho menos estudiadas que las proteínas de reserva de soja, y serán también estudiadas en este trabajo.

Nuestros estudios (Sobral y Wagner, 2007a) realizados por geles de poliacrilamida sobre el SSL mostraron bandas de escasa intensidad formadas por agregados, lipooxigenasa (90-100 kDa) y  $\beta$ -amilasa (57 kDa), siendo las fracciones mayoritarias las correspondientes a las subunidades de lectina (30 kDa) y al ITK (21 kDa).

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

El valor nutritivo de una proteína es función de varios factores, incluyendo el perfil de aminoácidos, su digestibilidad y el requerimiento de aminoácidos esenciales para el organismo (Erdman, 1995). Las proteínas de soja contienen todos los aminoácidos



## Introducción

esenciales requeridos en la nutrición humana, sin embargo, su contenido en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) es bajo si se lo compara con las proteínas de cereales, con las que se complementa generando una mezcla proteína tan completa como la de origen animal (FAO/WHO, 1991).

Cuando se lleva a cabo algún método de evaluación de la calidad de las proteínas, es importante considerar que los animales tienen diferentes requerimientos de aminoácidos esenciales que el hombre. En el caso de las ratas, muy empleadas en ensayos nutricionales, tienen mayor necesidad de lisina y metionina que el hombre. Con estas diferencias, la misma proteína puede mostrar diferente calidad nutricional para humanos que para animales (de Luna Jiménez, 2006).

**Tabla 4:** Requerimientos de aminoácidos esenciales propuestos en patrones y contenido de aminoácidos en las proteínas de productos de soja.

Aminoácido esencial	Patrones de requerimiento de aminoácidos			Productos proteicos de soja <sup>(1)</sup>		
	FAO 1973	FAO-WHO-UNU 1985	FNB-NAS 2002	Harina desgrasada de soja/pellets	Concentrado de soja <sup>(2)</sup>	Aislado de soja <sup>(3)</sup>
mg/g proteína						
<b>Fenilalanina + tirosina</b>	60	63	47	88	89	92
<b>Histidina</b>	0	19	18	26	25	28
<b>Isoleucina</b>	40	28	25	46	48	49
<b>Leucina</b>	70	66	55	78	79	82
<b>Lisina</b>	55	58	51	64	64	64
<b>Metionina + cisteína</b>	35	25	25	26	28	26
<b>Treonina</b>	40	34	27	39	45	38
<b>Triptofano</b>	10	11	11	14	16	14
<b>Valina</b>	50	35	32	46	50	50

FAO: Food and Agricultural Organization, WHO: World Health Organization, UNU: United Nations University, FNB: Food and Nutrition Board, NAS: National Academy of Sciences. (1): Endres (2001). (2): Campbell y col. (1985). (3): Kolar y col. (1985).

Con respecto a los ensayos de la calidad de la proteína de soja, generalmente se emplean el *score* de aminoácidos y la relación de eficiencia proteica (PER). El *score* o *cómputo* de aminoácidos, se refiere a la cantidad del aminoácido más limitante (primer limitante)

contenido en la proteína que se analiza, expresado como porcentaje de los requerimientos del organismo en estudio, generalmente ratas (Schaafsma, 2000). Para comparar el contenido de aminoácido limitante se utilizan patrones de aminoácidos como los que se muestran en la Tabla 4.

Cuando el patrón de requerimientos de aminoácidos es muy exigente, como es el caso del patrón FAO 1973, el *score* de aminoácidos calculado para una dada proteína es menor que el que resultaría en un ensayo en humanos. Por ejemplo, en base a este patrón los aislados de soja (compuestos mayoritariamente por proteínas de reserva) resultan con un el *score* del 74% debido a los aminoácidos azufrados como primer limitante. Sin embargo tienen un *score* del 100%, o sea que no contienen aminoácidos limitantes si se toman en cuenta los patrones más actuales, en los cuales los expertos realizaron las correcciones atribuidas a las diferencias mencionadas entre humanos y animales.

En el caso de la PER, que se obtiene con un ensayo *in vivo* con ratas jóvenes, como el cociente entre la tasa de crecimiento y la cantidad de proteína consumida, da un valor de 3,2 para caseína como proteína patrón y de 2,3 en ensayos con proteína de soja inactivada (Cheftel y col., 1989). De esta forma los bioensayos con roedores tienden a subestimar la calidad de la proteína de la soja para humanos.

La digestibilidad es independiente de la cantidad presente de un aminoácido determinado, por ello es la base de las metodologías de evaluación nutricional de los alimentos. Por definición, es la fracción de alimento consumido que no aparece en las heces y por lo tanto se absorbe en el tracto gastrointestinal (Stein y col., 2007).

Las proteínas de reserva de la soja aisladas son totalmente disponibles para el organismo, sin embargo, en la naturaleza no se presentan de esta forma. En la mayoría de los casos, se encuentran mezcladas con otros componentes biológicamente activos que están presentes en la semilla como son los inhibidores de la tripsina, los fenoles, los fitatos entre otros (Liu, 1999).

El calentamiento mejora el aprovechamiento al inactivar los inhibidores de tripsina y desnaturalizar las proteínas lo que aumenta aún más la digestibilidad. Dentro de los tratamientos térmicos más empleado se incluyen el vapor vivo, el hervido en agua, el tostado en seco, la extrusión-cocinado con humedad intermedia y las radiaciones con microondas (de Luna Jiménez, 2006).

Teniendo en cuenta en forma conjunta la digestibilidad y el cómputo de aminoácidos de una proteína surge el parámetro PDCAAS (cómputo de aminoácidos corregido por digestibilidad, valor máximo 1) que da una idea de calidad más completa ya que informa si

## *Introducción*

los aminoácidos aportados por la proteína ingerida van a ser digeribles y por lo tanto metabólicamente aprovechables. El PDCAAS fue adoptado desde 1993 por la FDA de EEUU, y es utilizado en la actualidad en forma generalizada en reemplazo de la PER ya que resulta mucho más preciso para evaluar la calidad recomendada de una dada proteína (FAO/WHO, 1991).

La digestibilidad de las proteínas en productos de soja correctamente inactivados y tratados para minimizar el efecto de otros factores antinutricionales es prácticamente 100%, y si se toma el cómputo respecto al patrón FAO 1985 (Tabla 4), el PDCAAS de las proteínas en esos productos resultaría cercano a 1,0. De acuerdo a la FAO/WHO (1991) los valores de PDCAAS fueron de 1,0 para caseína y albúmina de huevo, de 0,99 para concentrados de soja y 0,92 para aislados de soja (este último valor similar a la proteína de carne bovina) y valores inferiores para proteínas de otras fuentes vegetales.

El mayor PDCAAS de los concentrados de soja se debe al mayor contenido de aminoácidos azufrados (Tabla 4), y es atribuible al aporte que hacen las proteínas de suero de soja ya que los concentrados, por su modo de preparación contienen la totalidad de las proteínas del grano. Según informaron Kishi y col. (1987), las proteínas de suero de soja tienen un mejor balance de aminoácidos azufrados que las de reserva y un adecuado comportamiento nutricional cuando están correctamente inactivadas por calor.

Durante décadas la adecuación nutricional a base de proteínas de soja ha sido ampliamente demostrada en fórmulas infantiles en donde los requerimientos nutricionales son más críticos. Los estudios de Scrimshaw y Young (1979) mostraron que la suplementación con metionina en dietas de adultos usualmente no es necesaria debido a que, en los niveles normalmente consumidos de proteínas de otras fuentes, el aporte de los aminoácidos esenciales incluidos la metionina son más que adecuados. Es un hecho que los productos derivados de la soja tienen niveles excedentes de lisina por lo que es posible una complementación proteica con alimentos deficientes en este amino ácido tales como el trigo o el maíz.

Estudios realizados por Sipos (1988) mostraron que la soja, adecuadamente tratada como ingrediente en la industria alimentaria, resultaba adecuada para el consumo humano, al ser combinada con otras fuentes de proteína tales como la carne, leche o cereales. Para poblaciones de hombres jóvenes se alcanzó un equilibrio en el balance nitrogenado empleando concentrados de soja ingiriendo 95 mg/kg peso corporal lo cual no fue significativamente diferente a los 92 mg/kg necesarios cuando se utilizó huevo. En estos estudios se alcanzó un balance nitrogenado positivo luego de 82 días de alimentación

empleando concentrados como única fuente de nitrógeno con una ingesta de 0,8 g proteína/kg. Adicionalmente las proteínas de soja resultan menos colesterogénicas y aterogénicas que las proteínas animales –usualmente la caseína-.

Posteriormente, Messina (2004) demostró que la calidad de la proteína de soja resultó similar a las mejores proteínas de origen animal tales como la de carne o leche, sin la necesidad de tener que ser combinada con otras fuentes proteicas.

## **1.8 Comportamiento térmico de las proteínas de soja**

### **1.8.1 Proteínas de reserva**

El comportamiento térmico de las proteínas como de otros componentes de alimentos puede estudiarse con calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se han realizado numerosos estudios con globulinas de reserva de soja, entre los primeros se encuentra el realizado por Hermansson (1978) quien analizó por DSC la desnaturalización y agregación de aislados de soja comerciales bajo diferentes condiciones, informando transiciones endotérmicas con temperaturas de pico ( $T_p$ ) de 74 y 86°C. Adicionalmente a estas investigaciones se halló que las condiciones que favorecen la desnaturalización tales como los pH extremos tienen un efecto opuesto sobre la agregación y que las sales disminuyen tanto la agregación como la desnaturalización, probablemente debido a la estabilización de la estructura cuaternaria. Posteriormente, Kinsella y col. (1985) confirmaron que las globulinas de soja se resuelven por DSC en dos transiciones endotérmicas ubicadas a 75 y 90°C, correspondientes a la desnaturalización de  $\beta$ -conglucina (7S) y glicina (11S), respectivamente. Más adelante, Sorgentini y col. (1991) estudiaron también por DSC el comportamiento térmico de aislados comerciales con diferentes grados de desnaturalización. Los termogramas fueron obtenidos con dispersiones acuosas al 20% p/p de las muestras en estudio, empleando una rampa de calentamiento de 10°C/min. y expresando los datos en J/g de materia seca. Se halló para los aislados más nativos valores de entalpía de desnaturalización ( $\Delta H_d$ ) entre 5,4 y 6,7 J/g, con  $T_p$  similares a las halladas por Hermansson (1978). Posteriormente, Sorgentini y col. (1995) analizaron las propiedades térmicas de aislados preparados en el laboratorio, denominando “aislado de soja nativo” (ASN) preparado a partir de harina desgrasada activa (relación agua: harina, 10: 1), con extracción acuosa a pH 8,0, precipitación a pH 4,5, resuspensión con agua



## *Introducción*

destilada hasta 5% p/p, ajuste a pH 8,0 y secado por liofilización. Los valores de Tps para  $\beta$ -conglucina y glicina fueron de  $70 \pm 1$  y  $86 \pm 1^\circ\text{C}$ , respectivamente y el  $\Delta H_d$  total para el aislado ASN fue de 17,6 J/g, mayor que el registrado para los aislados comerciales. Ensayos más recientes (Sobral y col., 2010) arrojaron valores para ASN de  $77,5 \pm 0,5$  y  $91,0 \pm 0,4^\circ\text{C}$  y un  $\Delta H_d$  de  $17.1 \pm 0.8$  J/g.

Sorgentini y col. (1995) analizaron el comportamiento térmico de dispersiones acuosas de ASN luego de ser tratadas térmicamente (30 min., 80 o  $100^\circ\text{C}$ ) con concentraciones entre el 5 y 15%. La desnaturalización luego del tratamiento a  $100^\circ\text{C}$  fue total para todas las concentraciones, mientras que con el tratamiento a  $80^\circ\text{C}$  la desnaturalización fue parcial, hallándose un grado de desnaturalización del 74,0 y 47,6% para 5 y 15%, respectivamente. A esta temperatura, para todas las concentraciones se observó la total desnaturalización de  $\beta$ -conglucina, mientras que para la glicina (más termoestable) se observó una desnaturalización del 60% en el aislado calentado al 5% y una reducción en el grado de desnaturalización con el aumento de concentración.

Wagner y col. (1996) empleando un típico ASN realizaron el estudio del efecto del pH ácido sobre su desnaturalización, después de un período de mantenimiento en esas condiciones, seguido de neutralización y liofilización. Cuando a dispersiones al 6%, se les ajustaba el pH a 2,0 y se mantenía durante diferentes tiempos, la glicina se desnaturalizaba gradualmente hasta su desnaturalización prácticamente total tras un almacenamiento de 24 hs. En tanto que la  $\beta$ -conglucina no resultaba afectada a este pH. Estos hallazgos fueron confirmados tratando el aislado a pH 1,0 y 1,5 y empleando fracciones parcialmente purificadas de 7S y 11S a pH 1,0. Los termogramas de aislados tratados a pH 1,5 y 1,0 no mostraron la transición correspondiente a la glicina, hallándose una transición a  $76,5^\circ\text{C}$  (pH 1,5) o  $82,0^\circ\text{C}$  (pH 1,0) correspondiente a la  $\beta$ -conglucina. Adicionalmente hallaron una transición minoritaria a  $73,0^\circ\text{C}$  que fue atribuida a las proteínas de suero. A pH 3,5 se observó para la glicina una desnaturalización del 37,3%, la cual se incrementó rápidamente al 87,2% a pH 2,5. En contraste, para la  $\beta$ -conglucina se observó una desnaturalización del 20% entre pH 1,5-3,5 que se incrementó al 45% cuando el pH fue bajado hasta 1,0. Este efecto desnaturalizante del medio ácido sobre las proteínas de reserva de soja se pudo corroborar sobre muestras liofilizadas, en las cuales se eliminó el NaCl generado durante la neutralización, evitándose de este modo las distorsiones en la entalpía y las temperaturas de desnaturalización generadas por la mayor fuerza iónica.

Scilingo y Añón (1996) mostraron el efecto que tiene el calcio de incrementar la temperatura de desnaturalización de las globulinas de soja en tanto que Riblett y col. (2001) analizaron los aislados obtenidos de cuatro variedades de soja. Estos autores informaron diferencias entre las variedades pero hallaron que la entalpía de la glicinina fue el doble que la hallada para la  $\beta$ -conglucina. Estas diferencias fueron atribuidas al alto contenido de aminoácidos con grupos sulfhidrilos que pueden contribuir a la formación de puentes disulfuro y que pueden aumentar la entalpía de desnaturalización de la glicinina.

### **1.8.2 Proteína de suero de soja**

En contraste con las globulinas de reserva, las propiedades térmicas de las proteínas de suero no han recibido tanta atención. Los primeros datos calorimétricos fueron dados por Anderson (1992) quien informó que la desnaturalización del ITK en agua se producía a 61,1°C. Este valor resulta bajo para los posteriormente hallados, las diferencias pueden deberse tanto a la baja rampa utilizada en el DSC (1,2°C/min.) así como en el alto contenido de agua en la dispersión de harina (85,7%). Posteriormente, Sorgentini y Wagner (1999), en su estudio comparativo entre globulinas de reserva y proteínas de suero, hallaron que estas últimas se resolvieron en dos transiciones ubicadas a  $74,0 \pm 0,3$  y  $90,4 \pm 0,8$ °C correspondientes a la desnaturalización del ITK y la L respectivamente, cuando se analizaban dispersiones en agua destilada, con un  $\Delta H$  de  $10,8 \pm 1,2$ ° J/g. De este modo se pudo ver que la endoterma correspondiente a la desnaturalización de ITK coincide con la de  $\beta$ -conglucina, del mismo modo que lo está la de L con glicinina. Por el contrario, en condiciones de fuerza iónica ( $\mu$ ) creciente (NaCl 0,1-1,0 M), se observaron incrementos importantes en las  $T_p$  para glicinina y  $\beta$ -conglucina, pero menores en las  $T_p$  de las proteínas de suero. En las proteínas de suero, a  $\mu = 1,0$ , solo se hallaron incrementos de 7,7 y 2,5°C para ITK y L, respectivamente, en cambio en los aislados, en estas condiciones las  $T_p$  alcanzaron valores de  $95,0 \pm 1,6$  y  $110,8 \pm 1,3$ °C, o sea incrementos de 17,4 y 20,3°C para  $\beta$ -conglucina y glicinina, respectivamente. Este comportamiento permitió observar en los termogramas de ASN la aparición de un hombro ubicado a  $80,9 \pm 0,3$ °C en condiciones de fuerza iónica elevada ( $\mu > 0,75$ ) que fue atribuido a la presencia de proteínas de suero.

Más adelante, se analizaron las propiedades térmicas de un SSL hallando  $T_p$  de  $81,9 \pm 0,7$  ( $\Delta H = 5,1 \pm 0,1$  J/g proteína) y  $93,0 \pm 1,3$ °C ( $\Delta H = 6,3 \pm 0,2$  J/g proteína) correspondiente

a la desnaturalización de ITK y L (Sobral y Wagner, 2007a). Las muestras fueron analizadas en dispersiones acuosas al 30% p/p a una velocidad de calentamiento de 5°C/min. Los aumentos en las  $T_p$  respecto a los del trabajo anterior se deben a la presencia de solutos tales como carbohidratos ( $\approx 17\%$ ) y sales que aumentan la estabilidad de las proteínas de suero, mientras que el ligero aumento (5,6%) en la entalpía respecto a las proteínas aisladas fue atribuido a la estabilización de las proteínas en el SSL por la presencia de solutos. Adicionalmente fue posible identificar dos transiciones de menor tamaño ubicadas a  $108,0 \pm 1,6$  y  $122,2 \pm 1,0^\circ\text{C}$  correspondiente a la desnaturalización de fracciones proteicas minoritarias tales como el ITBB. A partir de dispersiones acuosas de SSL se aislaron proteínas con acetona, como consecuencia de la eliminación de solutos las  $T_p$  disminuyeron a  $74,2 \pm 0,6$  y  $93,3 \pm 0,2^\circ\text{C}$  para ITK y L, respectivamente. Posteriormente, los mismos autores analizaron el comportamiento térmico de las proteínas aisladas con acetona desde suero de soja preparado en el laboratorio y suero de tofu industrial (Sobral y Wagner, 2009). Las proteínas aisladas desde el SS presentaron transiciones a  $74,37 \pm 0,35^\circ\text{C}$  y  $88,52 \pm 0,02^\circ\text{C}$  para ITK y L respectivamente con un  $\Delta H$  de  $6,98 \pm 0,33$  J/g materia seca, hallándose además un pequeño pico a  $126,9^\circ\text{C}$  ( $\Delta H = 1,25$  J/g) atribuible al ITBB ya que un patrón comercial purificado arrojó un valor de  $128,76^\circ\text{C}$  ( $\Delta H: 9,17$  J/g). Por otra parte las proteínas aisladas desde el ST industrial dieron una única transición ubicada a  $138,52 \pm 2,46^\circ\text{C}$  atribuible al ITBB. El aumento en la  $T_p$  de esta transición respecto del patrón se debe al mayor contenido de sales de calcio en esta muestra.

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

A nivel mundial la fuente principal de proteínas es de origen vegetal, siendo las leguminosas y en particular de la soja, las que ocupan un lugar importante. Sin embargo, Las proteínas de origen vegetal no son utilizadas en forma directa en alimentación humana, sino que se las utiliza mayoritariamente para producir proteínas animales. Esta conducta se debe, en ocasiones, a una falta de costumbre en el consumo de proteínas de soja y en otros casos a limitaciones dadas por la falta de ciertas propiedades funcionales que son deseables para la elaboración de alimentos para el consumo humano. De esta manera, la utilización en forma directa de una mayor cantidad de proteínas de soja en la formulación de alimentos irá de la mano con el mejoramiento de propiedades funcionales tales como solubilidad, capacidad de formar espumas, emulsiones y geles.

## *Introducción*

La definición clásica de Cheftel y col. (1993) nos dice que las propiedades funcionales de las proteínas son aquellas propiedades, diferentes de las relacionadas con la nutrición que condicionan la utilización de las mismas. Mientras que Kinsella (1976) y Damodaran (1989), señalan que las propiedades funcionales son aquellas propiedades físicas y químicas que afectan el comportamiento de las proteínas en los alimentos durante su procesamiento, almacenamiento, preparación y consumo. Generalmente, las propiedades funcionales pueden clasificarse de acuerdo al tipo de interacción molecular en tres grupos:

- Propiedades dependientes de la interacción proteína-agua.
- Propiedades dependientes de la interacción proteína-proteína.
- Propiedades de superficie.

La clasificación mencionada indica la interacción predominante en una dada propiedad funcional, aun cuando los otros tipos de interacciones se encuentran presentes. Cuando la interacción predominante es con el agua se habla de propiedades de hidratación, siendo las más importantes: solubilidad, dispersibilidad, adsorción, absorción y retención de agua, hinchamiento y mojabilidad (Pilosof, 2000). Si las predominantes son las interacciones proteína-proteína, las propiedades funcionales relacionadas son la precipitación, formación de geles, floculación, coagulación, gelificación y la formación de estructuras tales como fibras, masas y películas. Finalmente, las propiedades superficiales son aquellas relacionadas con capacidad de la proteína de interactuar con una interfase (agua-aceite o agua-aire) y otorgarle estabilidad, resultando propiedades denominadas superficiales entre las que se destacan la capacidad de formar y estabilizar espumas y emulsiones, así como la de ligar grasa, aromas y sabores.

De los dos grupos en los que vimos que se dividen las proteínas de soja, proteínas de suero y proteínas de reserva, son estas últimas las más estudiadas desde el punto de vista funcional.

Las proteínas de reserva de soja, 7S y 11S, presentes en los aislados de soja tienen la capacidad de formar agregados al ser desnaturalizadas, dependiendo de la temperatura y la concentración, lo cual les otorga distintas propiedades funcionales como son la de formar dispersiones viscosas, geles y también la capacidad de absorber agua (Sorgentini y col. 1991, 1995). Las proteínas de suero de soja tienen baja tendencia a la agregación aun después de haber sido desnaturalizadas, por lo cual poseen una alta solubilidad, propiedad que permite su separación en forma de sueros.



## *Introducción*

Respecto a la solubilidad en agua, ya se mencionó en la sección 1.3.1 que las proteínas de reserva de la soja se caracterizan por ser insolubles en el rango de pH 3,7-5,2, que es próximo a su punto isoeléctrico (pH 4,2-4,6), propiedad que es aprovechada para su aislamiento, en tanto que las proteínas de suero de soja se mantienen total o parcialmente solubles en todo el rango de pH. Esto se vio reflejado en los resultados del estudio de las propiedades espumantes de las proteínas de suero de soja en forma comparativa con las de un aislado nativo de soja (Sorgentini y Wagner, 2002). Estos autores hallaron que dispersiones acuosas con 0,5 mg/ml de proteínas nativas de suero de soja, con o sin agregado de NaCl, son capaces de formar y estabilizar espumas por burbujeo en todo el rango de pH, resultado no logrado por las proteínas de reserva presentes en el aislado de soja. A pH 4,5, las proteínas de suero de soja prácticamente no incrementan su hidrofobicidad superficial, por lo cual conservan una solubilidad superior al 65% aun en presencia de NaCl. En estas condiciones las proteínas de suero de soja son capaces de formar y estabilizar espumas, con resultados comparativos a los obtenidos a pH 2,0 y 7,0 y superiores en todos los casos a los obtenidos con el aislado de soja.

Por otra parte, Mitidieri y Wagner (2002) y estudiaron en forma comparativa las propiedades emulsificantes de dispersiones acuosas de aislados de soja y de proteínas de suero de soja, y el efecto de la desnaturalización térmica. Este estudio se realizó a pH 7 por ser una condición de solubilidad equivalente (ya se había visto en el estudio de propiedades espumantes que a pH menores la solubilidad era el factor dominante sobre la funcionalidad). Hallaron que a pH 7 tanto los aislados como las proteínas de suero, nativos o desnaturalizados, son capaces en distintos grados, de formar y estabilizar emulsiones aceite en agua (o/w; fase dispersa aceite, fase continua agua). Informaron valores comparables de tamaño medio de gota y de índice de actividad emulsionante (que da información del área creada por mg proteína) para ambas proteínas y una leve mejora por efecto de la desnaturalización. Mitidieri y Wagner (2002) mostraron que la estabilidad de las emulsiones o/w frente al proceso de coalescencia inducido por agitación era superior en las emulsiones preparadas con aislado nativo de soja que con aislado desnaturalizado y con proteínas de suero de soja, sean estas nativas o desnaturalizadas. Los trabajos de Palazolo y col. (2004, 2005) mostraron por otra parte la capacidad de las proteínas de suero de soja nativas y desnaturalizadas para formar y estabilizar emulsiones aceite en agua frente a procesos de cremado, coalescencia y floculación, en forma comparativa con un aislado nativo y desnaturalizado de soja y con caseinato de sodio. Estos estudios fueron realizados solo con proteínas de suero de soja aisladas por precipitación con sulfato de amonio y

## ***Introducción***

empleando concentraciones muy bajas (1 mg/ml), condiciones en las cuales no se observaron diferencias marcadas en la capacidad de evitar el cremado y la floculación entre las proteínas de suero y el aislado de soja. Se informa en cambio una mejora interesante en la capacidad de reducir la coalescencia al desnaturalizar las proteínas de suero, más aun en condiciones de alta fuerza iónica.

En el presente trabajo de tesis se estudiaron las propiedades térmicas y funcionales de sueros de soja y de tofu y de sus proteínas aisladas, con el objeto de analizar el efecto que produce la presencia de componentes no proteicos tanto durante el proceso de desnaturalización y sobre las propiedades expresadas por las proteínas en el suero, como sobre las mismas propiedades pero medidas en las proteínas aisladas. Se evalúa la influencia del método de aislación de las proteínas del suero de soja, al comparar la precipitación por *salting out* con la precipitación por solvente. Las propiedades funcionales analizadas fueron la solubilidad y la formación-estabilización de emulsiones. En el último capítulo, se evaluó además la posibilidad de utilizar los sueros de soja y de tofu como crioprotectores en la estabilización de emulsiones congeladas. En un trabajo reciente (Palazolo y col., 2011) se estudió la estabilidad de emulsiones o/w frente a la congelación a -20°C durante 24 horas, informado que las emulsiones elaboradas con caseinato de sodio como emulsificante eran muy estables a diferencias de las emulsiones preparadas con aislado de soja, con las cuales se observaban procesos avanzados de coalescencia y floculación. Si bien se informa un leve aumento de estabilidad cuando las proteínas de reserva del aislado están previamente desnaturalizadas por calor, nunca se llega a la estabilidad dada por la proteína láctea.

En trabajos previos de muchos investigadores (Ghosh y col., 2006; Ghost y Coupland, 2008; Thanasukarn y col., 2004a, entre otros) se informó que, si bien la estabilidad de emulsiones o/w frente a la congelación depende de muchos factores (fase oleosa, tipo de emulsificante), es marcadamente dependiente de la composición de la fase acuosa. La estabilidad de emulsiones inestables en estado congelado puede ser mejorada por adición en la fase acuosa de azúcares, como son sacarosa, glucosa, fructosa, maltosa y trehalosa. En base a la baja estabilidad de las emulsiones o/w con aislados de soja y a la alta concentración de azúcares de los sueros de soja y de tofu, es que se decidió el estudio de la acción crioprotectora de estos sueros.

# **OBJETIVOS**

## **Objetivo general**

Analizar la composición y estudiar las propiedades térmicas, superficiales y el poder crioprotector de los sueros de soja y tofu y de sus proteínas aisladas.

## **Objetivos particulares**

-Obtener sueros de soja (SS) y tofu (ST) líquidos y deshidratados por liofilización y secado térmico. Analizar la composición y la actividad antitriptica de los sueros y sus proteínas aisladas; y sobre estas últimas determinar las fracciones proteicas presentes.

-Analizar el comportamiento térmico de suero de soja liofilizado (SSL) y de sus proteínas aisladas y la dependencia con el contenido de humedad. Evaluar el efecto de las condiciones de preparación y el almacenamiento de las muestras y detectar las posibles interacciones entre el aislado de soja nativo (ASN) y las proteínas de sueros (PS).

-Determinar la solubilidad acuosa de las proteínas aisladas de SS y ST por distintos métodos (por *salting out* y con solvente), y analizar el efecto del almacenamiento y del tratamiento térmico. Determinar propiedades fisicoquímicas y superficiales de la fracción total y soluble de las PS obtenidas, antes y después de su desnaturalización térmica.

-Analizar la formación y estabilización de emulsiones aceite en agua (o/w) empleando sueros deshidratados o sus proteínas aisladas como agente emulsificante, en forma comparativa con ASN. Analizar el efecto de la concentración proteica y el estado de desnaturalización sobre la microestructura y los procesos de desestabilización de la emulsión frente al almacenamiento.

-Investigar las propiedades crioprotectoras de los sueros de soja y de tofu deshidratados sobre emulsiones o/w modelo, preparadas con diferentes proteínas y sometidas a un proceso de almacenamiento congelado a corto y largo plazo. Determinar las mejores



combinaciones emulsión modelo/crioprotector y comparar el desempeño relativo de los sueros entre sí y con sacarosa como crioprotector control.

## **2. MATERIALES y MÉTODOS**

Los reactivos utilizados para llevar a cabo todas las experiencias realizadas en este trabajo fueron de calidad p.a.

### **2.1 Preparación de aislado nativo y suero de soja**

La materia prima de partida para la preparación de aislado nativo y suero de soja fue la harina de soja desgrasada comercial, no inactivada térmicamente (para prevenir la desnaturalización), gentilmente provista por la empresa Solae-Latinoamérica (SP, Brasil). Según los datos brindados por el proveedor la harina tienen un contenido de humedad del 5,0% y los componentes mayoritarios (expresados en % p/p base seca) tienen valores medios de: 56,0% proteína cruda (N×6,25); 7,0% ceniza, 3,5% lípidos totales (0,8% triglicéridos) y 14,0% de fibra dietaria, la cual se distribuye en 12,7% de fibra insoluble y 1,3% de fibra soluble.

La obtención de aislados de soja fue realizada en el laboratorio en condiciones controladas para lograr obtener proteínas con un bajo nivel de desnaturalización y alta solubilidad. Se siguió la metodología básica (Petruccelli y Añón, 1984; Sorgentini y Wagner, 1999) que puede resumirse en las siguientes etapas: a) Preparación de una dispersión acuosa de harina en agua a pH = 8,0; para ello se dispersó la harina en agua destilada primero con ayuda de una varilla de vidrio y posteriormente con agitación magnética, durante 2 h a temperatura ambiente (relación harina: agua de 1: 10 p/v); b) eliminación de la fracción insoluble mediante centrifugación (10400 x g, 15 min., 20°C) (*Beckman Coulter Avanti*); c) precipitación isoeléctrica de las globulinas de reserva (GR) por acidificación del extracto acuoso a pH = 4,5 usando HCl 1,0M, con ajustes periódicos para mantener el pH en 4,5 durante 2 h a 4°C; d) separación mediante centrifugación (10400 x g, 20 min., 4°C) de las GR del sobrenadante isoeléctrico o suero de soja (SS); e) lavado del precipitado realizando una disgregación con varilla de vidrio de las GR obtenidas con agua destilada a pH 4,5, seguido de una centrifugación (10400 x g, 20 min., 4°C); f) resuspensión del precipitado conteniendo las GR con un volumen de agua destilada necesario para alcanzar una concentración de 40 mg de muestra/ml y solubilización por ajuste a pH 8,0 (primero con NaOH 2,0M y posteriormente con NaOH 0,5M); g) congelación y secado mediante liofilización (*equipo HETO FD4*) de la solución acuosa de GR para dar por resultado el aislado de soja nativo (ASN).

Al SS obtenido se le agregó azida sódica al 20% p/v hasta lograr una concentración de 0,03% p/v. Se almacenó a 4°C hasta el momento de su empleo, que nunca fue superior a 2 días, excepto en los casos especiales que se describirán en la sección 2.6.

### **2.2 Obtención de sueros de soja y de tofu deshidratados**

El SS proveniente de la obtención del aislado, con su pH original (pH 4,5) fue secado por liofilización para obtener el suero de soja liofilizado (SSL). Del mismo modo, la liofilización de suero de tofu (ST), proveniente de la obtención de tofu a escala industrial (donado por Soyana S.H.), resultó en la muestra de suero de tofu liofilizado (STL).

Una parte de ambos sueros, se deshidrató por calentamiento obteniéndose las muestras SSST y STST, que corresponden a suero de soja y suero de tofu secados térmicamente, respectivamente. Este proceso de secado comenzó con una concentración del suero hasta lograr una reducción del 85% del volumen inicial, realizado con un rotavapor R-124 BÜCHI a 50°C, en  $50 \pm 5$  min. hasta alcanzar una presión de 60 mm Hg. El jarabe obtenido fue vertido en bandejas de acero inoxidable en un espesor de  $\approx 5$  mm y se continuó su secado en un horno de vacío (Gallenkamp) durante 4 h a 50°C y 10 mm Hg.

El producto obtenido en forma de hojuelas pegajosas fue retirado de las bandejas, congelado en nitrógeno líquido y molido con un molinillo eléctrico hasta obtener un polvo fino. Se realizó un proceso de secado secundario para eliminar trazas de humedad, colocando las muestras en frascos con tapas perforadas dentro de frascos de mayor capacidad conteniendo diferentes agentes deshidratantes.

Este secado secundario fue realizado a temperatura ambiente utilizando de manera secuencial gel de sílica (5 días) y óxido de calcio (7 días) los cuales son deshidratantes reversibles que se ponen en equilibrio con atmósferas que contienen 0,03 y 0,007 mg agua/l de aire seco, respectivamente. El secado final fue realizado a temperatura ambiente durante 5 días, empleando pentóxido de fósforo que lleva la humedad relativa prácticamente a cero.

### **2.3 Obtención de suero de soja liofilizado calentado**

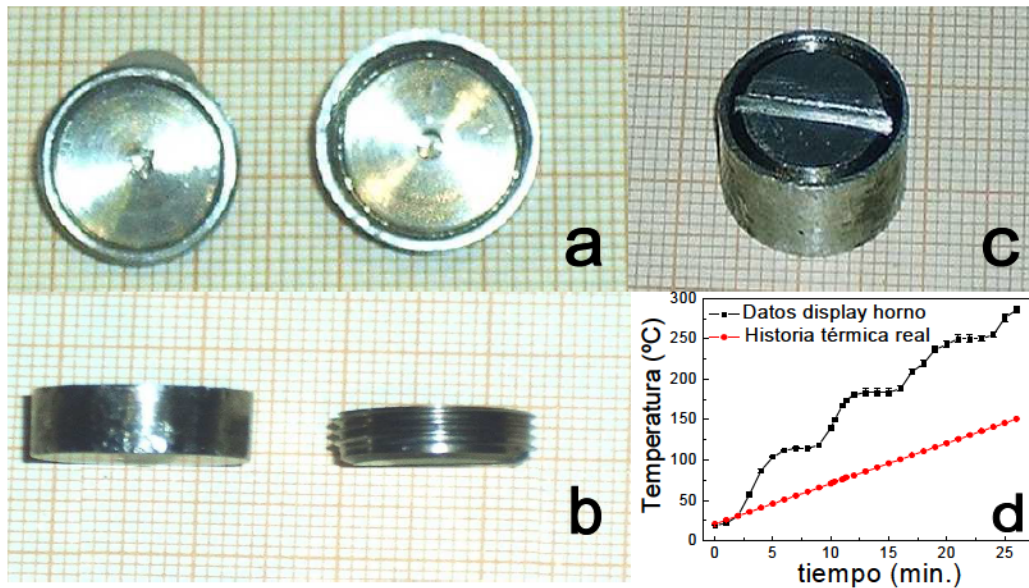
A pequeña escala, empleando un calorímetro diferencial de barrido DSC modelo Q-100, *T.A. Instruments*, el SSL fue tratado térmicamente en condiciones anhidras dentro de



## Materiales y Métodos

cápsulas comerciales de aluminio (*T.A. Instruments*), las cuales fueron selladas herméticamente. ( $\approx 20$  mg SSL/cápsula). Se realizó un tratamiento térmico hasta diferentes temperaturas finales (90-180°C). Finalizado el tratamiento térmico las cápsulas fueron enfriadas (hielo, 30 min.) y secadas con papel absorbente obteniéndose la muestra SSL calentado (SSLC).

Para la obtención de cantidades mayores de SSLC, ya sea para la preparación de emulsiones o el aislamiento de proteínas, se realizó el tratamiento térmico del SSL hasta 150°C empleando una cápsula reutilizable de acero inoxidable de mayor tamaño (Figura 2). El SSL fue colocado en condiciones anhidras en alícuotas de  $200 \pm 50$  mg dentro de la mitad derecha de la cápsula (Figuras 2a,b) y se prensó con un pistón de acero inoxidable para eliminar aire atrapado y mejorar la transmisión del calor. Esta mitad conteniendo la muestra compactada fue conectada a la mitad izquierda de la cápsula y enroscada hasta que ambas mitades hicieron contacto asegurando un buen nivel de sellado (Figura 2c). Esta cápsula reutilizable exhibió niveles de estanqueidad similares al de las cápsulas comerciales de aluminio selladas herméticamente. El tratamiento térmico fue realizado utilizando un horno eléctrico computarizado (*Indef., mod. 332*).



**Figura 2:** Fotografías de la cápsula reutilizable de acero inoxidable. a) Cápsula abierta vista desde arriba; b) vista de lado. c) cápsula cerrada y d) datos del *display* de horno (curva superior en negro) e historia térmica real del SSL (curva inferior en rojo).

Se ajustaron los parámetros operativos del horno de modo de obtener una velocidad de calentamiento de 5°C/min. en el centro del piso del horno. En este lugar fue colocada en forma simultánea la cápsula reutilizable conteniendo el SSL y el dispositivo registrador

autónomo (*DS1921G Thermochron iButton*) el cual registró la historia térmica real del SSL. La curva superior de la Figura 2d fue construida a partir de los datos del *display* del horno mientras que la inferior corresponde a la historia térmica real del SSL.

La mayor temperatura de la curva superior se atribuye a la ubicación de la termocupla (parte superior del horno) mientras que su proximidad con la pared del horno (donde están las resistencias) determina que la rampa se aproxime por una serie de escalones dados por el encendido y apagado de las resistencias del horno.

Una vez alcanzado los 150°C la cápsula fue retirada del horno realizando las operaciones de enfriamiento y recuperación de la muestra. El tratamiento térmico fue realizado hasta 150°C en base a trabajos previos (Sobral y Wagner, 2007a) ya que con estas condiciones se consigue la inactivación del ITK en un 95%.

### **2.4 Manipulación y almacenamiento de los sueros de soja y tofu deshidratados**

Los sueros de soja y de tofu son muy higroscópicos debido al alto contenido de sales y azúcares que contienen, muchos de estos se hallan en estado amorfo o tienen tendencia a coordinarse con agua, como es el caso de la rafinosa.5 H<sub>2</sub>O. En condiciones controladas (25°C, HR 75,0%) se halló que el SSL anhidro, incrementó su masa en  $9,08 \pm 0,37$ ,  $20,78 \pm 1,40$  y  $34,18 \pm 1,26\%$  p/p en 30, 120 y 450 min. respectivamente, debido a la hidratación (Sobral y Wagner, 2007a). La alta velocidad de hidratación determinó la implementación de procedimientos experimentales que reduzcan cambios en la composición del SSL por hidratación.

Los sueros de soja y tofu liofilizados o deshidratados térmicamente, altamente higroscópicos, fueron colocados dentro de recipientes de mayor tamaño conteniendo sílica gel y almacenados a -80°C. Se utilizó esta temperatura para estar por debajo de la T<sub>g</sub> del sistema (Sobral y Wagner, 2007a) y minimizar las reacciones de cristalización y recristalización de los azúcares presentes.

### **2.5 Obtención de proteínas de sueros de soja y de suero de tofu**

El estudio de los sueros como productos integrales proporcionará información sobre el comportamiento de los macrocomponentes presentes en los mismos, fundamentalmente

proteínas, glúcidos y sales dentro de una compleja matriz en donde dichos componentes interaccionan de una manera poco predecible. Para profundizar y modelar los estudios se procedió al aislamiento de las proteínas mediante dos metodologías diferentes: *salting out*, el cual es un método reconocido empleado a escala de laboratorio y precipitación con un solvente orgánico en frío, método empleado en el ámbito industrial.

### **2.5.1 Precipitación por *salting out*: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 90%**

Se aislaron las proteínas por precipitación con sulfato de amonio a partir de SS a dos valores de pH: a pH 4,5 (pH de obtención del suero) y luego de un ajuste a pH 8,0 (con NaOH 0,1N). Se utilizó  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 90% de saturación (635,4 g de sal/l suero) según el procedimiento detallado por Iwabuchi y Yamauchi (1987). Estos autores hallaron que bajo estas condiciones las proteínas de suero de soja (PSS) eran precipitadas en forma efectiva. Dicha cantidad de sal fue agregada en forma progresiva en un lapso de 30 min. sobre el SS en condiciones de agitación magnética suave, permitiendo la precipitación de las proteínas durante 2 h, en condiciones estáticas, para luego separarlas por centrifugación a 10400 x g, a 20°C durante 20 min. Las proteínas obtenidas fueron suspendidas en agua destilada y desaladas mediante diálisis (membrana de diálisis Sigma, WT 12000), contra agua destilada conteniendo 0,03% de azida sódica, a 4°C durante 48 h (realizando 3 cambios de agua por día). La solución proteica, esencialmente libres de sales, fue congelada y liofilizada. Las proteínas de suero precipitadas con sulfato de amonio secadas fueron denominadas PSS<sub>am</sub>. Cuando corresponda se agregará el pH de partida del suero.

### **2.5.2 Precipitación con solvente: acetona en frío**

Como se describió en 2.1 se aislaron las proteínas de suero a partir de SS a pH 4,5 y pH 8,0 y de ST con su pH original (pH 5,5) mediante precipitación con acetona a 0°C, (relación acetona: suero de 1:1 v/v). Se empleó acetona por su menor tendencia a causar la desnaturalización de proteína en comparación con el etanol. Adicionalmente, con acetona se requiere una menor cantidad para lograr el mismo efecto precipitante y al ser más volátil permite su eliminación a menor temperatura y es posible trabajar a 0°C minimizando el proceso de desnaturalización (Scopes, 1982).



## ***Materiales y Métodos***

Antes de comenzar la precipitación se realizó un enfriamiento previo a 0°C de todo el material volumétrico a utilizar, de los sueros, del solvente y se trabajó en condiciones que permitan la eliminación del calor generado durante la adición del solvente (baño hielo o cámara de 0°C). Adicionalmente, el empleo de bajas temperaturas reduce la flexibilidad conformacional de las proteínas e impide que el solvente penetre a la estructura interna y cause desestabilización (Scopes, 1982).

El agregado del solvente sobre las muestras se realizó por goteo en un lapso de 10-15 min., empleando condiciones suaves de agitación, evitando la formación de espuma e interfases con posible efecto desnaturalizante. A pequeña escala se trabajó en el laboratorio utilizando un baño de hielo, manteniendo la temperatura de los sueros o soluciones y de la acetona a 0°C y realizando el agregado del solvente con pipeta automática en condiciones de agitación magnética.

Cuando la preparación se realizó a una mayor escala se emplearon cámaras de -20 y 0°C para la acetona y los sueros respectivamente. En ambos casos las muestras fueron mantenidas durante toda la noche. La operación de precipitación fue llevada a cabo trasladando desde la cámara de -20°C alícuotas de 150 ml de acetona hacia la cámara de 0°C las cuales fueron colocadas en una ampolla de decantación que permitió el goteo en condiciones controladas sobre un volumen igual de suero o solución en condiciones de agitación magnética.

La velocidad de goteo de la ampolla se ajustó de modo de permitir el agregado del solvente en el intervalo de tiempo mencionado. Se aseguró que la temperatura se mantuviera en las proximidades de 0°C (con termómetro dentro de la mezcla). Las proteínas precipitadas fueron separadas mediante centrifugación usando un rotor previamente enfriado a 4°C, empleando las condiciones vistas en 2.5.1 a 4°C, lavadas y resuspendidas en agua destilada, vertidas en bandejas y secadas por liofilización.

De esta manera, a partir de SS y ST se obtuvieron las proteínas de suero de soja (PSS<sub>ac</sub>) y las proteínas de suero de tofu (PST<sub>ac</sub>), respectivamente. A estas abreviaturas se les agregará el pH del suero para precisar la muestra obtenida.

A modo de resumen se presenta en la Tabla 5 las variables de obtención de las proteínas a partir de sueros de soja y de suero de tofu y sus nomenclaturas usadas para el estudio.



**Tabla 5:** Condiciones de preparación de las proteínas aisladas de suero de soja (PSS<sub>am</sub> y PSS<sub>ac</sub>) y de suero de tofu (PST<sub>ac</sub>).

Materia prima de partida	pH del suero	Tipo de precipitación	Nomenclatura
Harina fresca	8,0	Sulfato de amonio	PSS <sub>am-8</sub>
	4,5		PSS <sub>am-4,5</sub>
Harina fresca	8,0	Acetona a 0°C	PSS <sub>ac-8</sub>
	4,5		PSS <sub>ac-4,5</sub>
Suero de tofu	5,5		PST <sub>ac-5,5</sub>

## 2.6 Obtención de proteínas a partir de sueros de soja modificados

### 2.6.1 Proteínas de SS modificados en su proceso de obtención

Las características del suero de soja y por ende de las proteínas presentes en el mismo, pueden ser modificadas si se varían algunas condiciones en su proceso de obtención. El almacenamiento del suero es un paso obligatorio luego de su obtención. Dado que se le adiciona azida sódica como antimicrobiano puede ser almacenado en estado refrigerado o congelado, pudiendo variar además el tiempo en el que se lo mantiene en estas condiciones.

**Tabla 6:** Condiciones de preparación de las proteínas aisladas de suero de soja (PSS<sub>am</sub> y PSS<sub>ac</sub>) y de suero de tofu (PST<sub>ac</sub>) modificadas por las condiciones de obtención y materias primas.

Materia prima de partida	Condiciones del suero		Tipo de precipitación	Nomenclatura
	Almacenamiento en frío a pH 4,5	pH final		
Harina fresca	4 semanas a -20°C	8,0	Sulfato de amonio	PSS <sub>am-8</sub> <sup>(4s, -20C)</sup>
	1 semana a 10°C	8,0		PSS <sub>am-8</sub> <sup>(1s, 10C)</sup>
	4 semanas a 10°C	8,0		PSS <sub>am-8</sub> <sup>(4s, 10C)</sup>
Harina almacenada 2 años	No	8,0	Acetona a 0°C	PSS <sub>ac-8</sub> <sup>(H2)</sup>
		4,5		PSS <sub>ac-4,5</sub> <sup>(H2)</sup>
Harina almacenada 8 años	No	8,0		PSS <sub>ac-8</sub> <sup>(H8)</sup>

Por otro lado, también se obtuvieron sueros a partir de harinas de soja no frescas, o sea que sufrieron un almacenamiento previo a la extracción, lo cual dio origen a otras muestras de proteínas de suero de soja. En base a estas variables en los sueros de partida se obtuvieron las PSS que se indican en la Tabla 6.

### **2.6.2 Proteínas aisladas a partir de SS liofilizados y liofilizados calentados**

Del mismo modo que se describió en 2.5.2, se aislaron proteínas de dispersiones acuosas de sueros liofilizados y calentados (SSLC) por precipitación con acetona en frío.

El aislamiento de las proteínas a partir de sueros deshidratados con y sin calentamiento (SSL y SSLC) se realizó solubilizando los mismos en agua destilada con agitación magnética a temperatura ambiente durante 2 h, a una concentración de 10-50 mg/ml y procediendo luego de la manera detallada para SS. Las proteínas obtenidas fueron denominadas PSSL y PSSLC, respectivamente.

### **2.6.3 Molienda y secado secundario**

La molienda de todas las muestras proteicas (ASN, PSS<sub>am</sub>, PSS<sub>ac</sub>, PSSLC, PST<sub>ac</sub>) fue realizada con un mortero tradicional de laboratorio y fueron doblemente tamizadas empleando un tamiz de acero inoxidable con un tamaño de poro de 18 Mesh (1 mm de diámetro) a fin de uniformar el tamaño de las partículas obtenidas. Las fracciones que no lograron pasar el tamiz fueron molidas nuevamente hasta alcanzar el tamaño deseado.

Luego de las etapas de molienda/tamizado se realizó la eliminación de trazas de humedad remanentes o incorporadas durante estos procesos. Este secado secundario fue llevado a cabo como se detalló en la sección 2.2 utilizando recipientes cerrados de baja permeabilidad, opacos a la luz y con tapa a rosca. Tanto el secado como las condiciones de almacenamiento se ajustaron a las características de cada muestra en particular. Para las proteínas aisladas -menos higroscópicas que los sueros de soja y tofu- la deshidratación se realizó en forma secuencial con gel de sílica y óxido de calcio.

Los frascos conteniendo las muestras proteicas deshidratadas fueron almacenados a 4°C dentro de recipientes de mayor tamaño conteniendo sílica gel, para minimizar su deterioro y prevenir la agregación. Solo en ensayos particulares tales como los ensayos de inversión (sección 2.9.2) en donde se requirió PSS<sub>ac</sub> en condiciones rigurosamente anhidras, el

secado secundario incluyó una etapa adicional de secado con  $P_2O_5$  durante 5 días a temperatura ambiente.

### **2.7 Caracterización y determinación de la composición de sueros y proteínas aisladas**

#### **2.7.1 Contenido de extracto seco, densidad y lípidos**

*Extracto seco:* se determinó en sueros líquidos secando en estufa a  $105^{\circ}C$  hasta peso constante previa liofilización, expresándolo en % p/p.

*Densidad:* se midió por picnometría a  $25^{\circ}C$  utilizando matraces de 250 ml adecuadamente limpiados. Las determinaciones fueron realizadas en forma relativa a la del agua destilada, expresándose la densidad en g/l.

*Contenido de lípidos:* se determinó sobre los sueros líquidos en forma directa empleando el método de Folch y col. (1958) con una relación suero: solvente 1: 1 v/v. La extracción fue realizada por agitación magnética (1 h) empleando una mezcla cloroformo: metanol 2: 1 v/v. El sistema bifásico obtenido fue filtrado y centrifugado en tubos de vidrio tapados a baja velocidad (2500 r.p.m., 5 min.) descartando con pipeta la fase acuosa superior. La fase orgánica inferior conteniendo los lípidos fue evaporada a  $50^{\circ}C$  en un recipiente previamente pesado. El contenido de lípidos (% p/v) fue calculado como  $100 \times (m_L/v_S)$ , donde  $m_L$  son los g de lípidos provenientes de  $v_S$  ml de suero.

#### **2.7.2 Contenido de minerales**

*Cenizas:* se determinaron mediante calcinación a  $550^{\circ}C$  hasta alcanzar cenizas de color blanco-grisáceo. En muestras sólidas, el contenido de cenizas (% p/p) fue calculado como  $100 \times (m_c/m_M)$ , donde  $m_c$  son los g de cenizas provenientes de  $m_M$  g de muestra. En el caso de muestras líquidas los resultados fueron expresados de manera directa en g de cenizas/l de muestra.

## ***Materiales y Métodos***

*Calcio y magnesio:* estos elementos se determinaron sobre las cenizas de las proteínas aisladas liofilizadas. Para ello las cenizas fueron disueltas en ácido nítrico 0,14N y lantano 0,5%, llevadas hasta un volumen apropiado en matraz aforado y filtradas por membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Sobre las soluciones resultantes se determinó el contenido de calcio y magnesio por espectroscopía de absorción atómica (método de referencia 7450) utilizando un espectrofotómetro Shimadzu AA-6650. El porcentaje de calcio o magnesio fue calculado como  $m_m \times (m_c/100)$  donde  $m_m$  son los g de elemento determinado en 100 g de cenizas y  $m_c$  son los g de cenizas en 100 g de muestra. Todas las determinaciones fueron realizadas al menos por duplicado.

*Minerales libres:* fueron cuantificados mediante medidas de conductividad. Para ello se prepararon soluciones al 0,5 g/l de las proteínas liofilizadas en agua bidestilada (conductividad =  $0,89 \pm 0,12 \mu\text{S}/\text{cm}$ ) empleando agitación magnética suave durante 2 h. Las soluciones fueron preparadas dentro de un contenedor con un radio de curvatura superior al de la celda conductimétrica, que permita una separación de al menos 8 mm en torno de los límites de la celda a fin de minimizar los efectos de borde. Las medidas fueron realizadas en condiciones estáticas a  $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  (ASTM D 1125-64) empleando un conductímetro YSI modelo 35 y una celda conductimétrica YSI 3401. Para la realización de las medidas la celda fue sumergida dentro de la solución proteica lentamente varias veces para eliminar burbujas de aire y obtener una lectura precisa. Las lecturas de conductancia entregadas por el equipo expresadas en  $\mu\text{Siemens}$  fueron convertidas en conductividad (CE) multiplicando dichos valores por la constante de la celda, definida como el cociente  $d/A$ ; en donde  $d$  = distancia entre los electrodos y  $A$  = área de los electrodos. La constante de la celda utilizada ( $1,084 \pm 0,067/\text{cm}$ ) se determinó midiendo la conductancia de una solución de KCl anhidro 0,01 N en agua bidestilada a varias temperaturas.

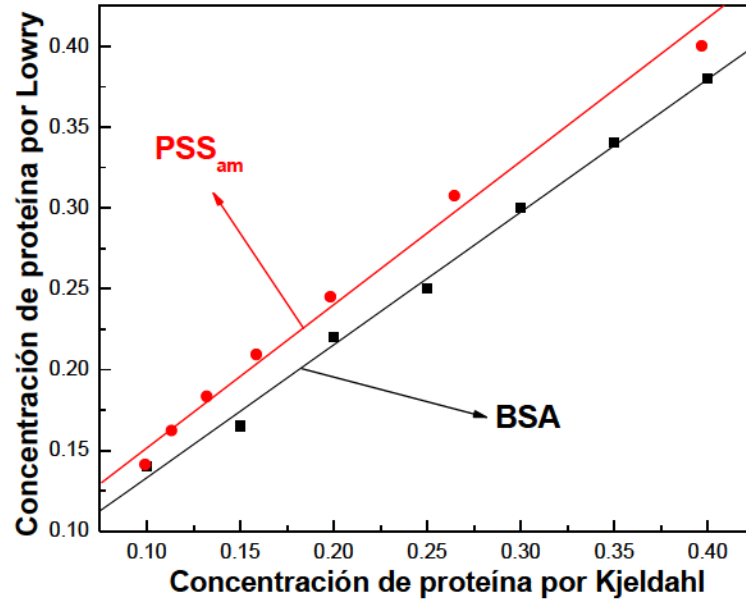
*Conductividad equivalente (CE):* Se determinó la CE de soluciones acuosas de ASN y PSS. Se determinó una correlación entre la CE y la concentración de NaCl (en mol/l):  $CE (\mu\text{S}) = 5,266 + 96379,19 \times [\text{NaCl}]$  ( $r^2 = 0,99$ ). A partir de esta correlación fue posible calcular la concentración de sales libres expresada en g NaCl/g de muestra.



### **2.7.3 Contenido de proteínas**

*Método de Kjeldahl:* Las proteínas aisladas y los sueros enteros deshidratados (con o sin tratamiento térmico) fueron utilizados en diversos ensayos, entre ellos la preparación de emulsiones. A fin de realizar estos ensayos empleando cantidades equivalentes de proteína se cuantificó en las muestras el contenido de proteína total de las muestras por el método de Kjeldahl. Se utilizó un equipo BÜCHI integrado por una unidad digestora K-435 y una unidad destiladora K-350. Las muestras líquidas fueron vertidas en el tubo digestor en forma directa, mientras que las deshidratadas fueron envueltas en poliestireno, debido a que es un polímero hidrocarbonado que no aporta nitrógeno. Este procedimiento asegura que la muestra alcance la base del tubo y se eviten pérdidas de muestra o que parte de la misma quede adherida en las paredes de los tubos (retrasando su digestión). La digestión se realizó a ebullición utilizando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y una mezcla catalizadora formada por  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en relación 10: 1 p/p. Finalizada la digestión (solución límpida, ausencia de humos blancos y puntos negros) se permitió el enfriamiento de los tubos conteniendo las soluciones ácidas con el  $\text{NH}_4^+$  retenido proveniente de las muestras. Posteriormente los tubos fueron transferidos y conectados a la unidad destiladora que permite el agregado en forma semiautomática de NaOH al 32% hasta alcalinidad (color pardo) de modo de desplazar el  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NH}_3$ . El  $\text{NH}_3$  liberado fue destilado por arrastre con vapor y retenido en 50 ml de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  al 4% v/v conteniendo 400  $\mu\text{l}$  de indicador combinado de Mortimer (0,016% p/v rojo de metilo, 0,083% p/v verde de bromocresol en etanol). Las titulaciones se realizaron con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 N hasta viraje del indicador al color inicial. Las determinaciones fueron realizadas al menos por duplicado, realizando dos blancos de reactivos por cada lote de digestión (12 tubos). El factor de conversión usado para convertir nitrógeno total en proteína fue de 6,25 g de nitrógeno/g de proteína.

*Método de Lowry con previa eliminación de azúcares y nitrógeno no proteico (NNP):* Debido a la simplicidad y menores requerimientos de muestra, el contenido de proteína soluble se determinó por el método de Lowry (1951). Este método no fue utilizado en forma directa (sin eliminación de azúcares) debido a la interferencia que ejercen los azúcares (Hall, 1996) y fue empleado para aquellas proteínas precipitadas con ácido tricloroacético (TCA) luego de eliminar los azúcares interferentes.



**Figura 3:** Correlación entre los métodos de Lowry y Kjeldahl empleando diferentes proteínas de referencia. BSA: seroalbúmina bovina, en negro. PSS<sub>am</sub>: proteínas de suero de soja precipitadas con sulfato de amonio en rojo. Las concentraciones de proteína por ambos métodos están expresadas en mg/ml.

Los sueros líquidos se llevaron a una concentración de TCA al 12% p/v, o para el caso de los sueros deshidratados dicho agregado se realizó sobre soluciones conteniendo 10 mg producto deshidratado/ml. A las proteínas precipitadas se las separó por centrifugación (9300 x g, 20°C, 20 min.) descartando los sobrenadantes. Para asegurar la eliminación de azúcares y NNP se realizaron 5 lavados (con sus correspondientes centrifugaciones) utilizando solución acuosa de TCA al 12% p/v, dispersando los precipitados con ayuda de un agitador mecánico. Las proteínas precipitadas (sin NNP ni azúcares libres) se solubilizaron con NaOH 0,1N y sobre las soluciones resultantes se determinó el valor de proteína, expresando los resultados como % de proteína en la muestra.

A fin de poder comparar la proteína precipitada con TCA (Proteína-TCA) con los valores de proteína (Nx6,25) utilizadas en el resto del trabajo, se construyeron rectas de calibración empleando proteínas de suero aisladas con sulfato de amonio y posteriormente dializadas en el laboratorio (PSS<sub>am</sub>) en forma comparativa con seroalbúmina bovina (BSA) comercial (Sigma). La muestra PSS<sub>am</sub> seleccionada fue la de mayor solubilidad (sección 5.2) y pureza (sección 3.2) con un contenido de proteína cercano a 100 determinado por Kjeldahl (Tabla 9). En la Figura 3 se muestran rectas típicas halladas al emplear esta proteína patrón en comparación con BSA las cuales permitieron establecer las siguientes correlaciones:

Calibración con BSA.

$$[\text{Proteína}] = [\text{Proteína}]_{\text{TCA}} \times 0,8214 + 0,0511 \quad (r > 0,98) \quad (1)$$

Calibración con PSS<sub>am</sub>

$$[\text{Proteína}] = [\text{Proteína}]_{\text{TCA}} \times 0,8623 + 0,0677 \quad (r > 0,98) \quad (2)$$

Debido a que la ecuación 2 tiene una pendiente más cercana a 1 y a la mayor similitud de las PSS<sub>am</sub> con las proteínas analizadas en este trabajo, se utilizó la ecuación 2 para expresar los valores de proteína precipitadas con TCA en proteína.

### **2.7.4 Contenido de carbohidratos**

Tanto para sueros como para proteínas aisladas los carbohidratos totales fueron determinados empleando el método del fenol sulfúrico (Dubois, 1956). Este método fue seleccionado debido a su elevada sensibilidad escasas interferencias y su capacidad de determinar azúcares simples, oligo y polisacáridos así como sus derivados incluidos los metil-eter con grupos reducibles libres o potencialmente reducibles.

En esta metodología las muestras son tratadas con fenol de alta pureza y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, realizando en simultáneo rectas de calibración en el rango lineal (10 a 70 µg/ml) con glucosa patrón como referencia. La cuantificación se realizó espectrofotométricamente a 480 y 490 nm correspondientes a los máximos de absorción para pentosas y hexosas respectivamente. Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado, realizando tres lecturas de cada una para minimizar errores.

Para el caso de las proteínas aisladas las determinaciones del contenido de proteína por Kjeldahl (sección 2.7.3) junto al contenido de carbohidratos totales permite calcular la relación hidratado de carbono totales a proteína (HC: P) expresada como mg de carbohidratos/100 mg de proteína.

### **2.7.5 Carbohidratos coprecipitados con las proteínas**

La determinación de proteínas y carbohidratos en los precipitados obtenidos con TCA sirvió para evaluar trazas de carbohidratos que puedan coprecipitan con las proteínas y no sean eliminados durante las etapas de lavado. Estos precipitados fueron obtenidos a partir

## ***Materiales y Métodos***

de suero de soja y de proteínas aisladas de los mismos. Para el caso de los sueros deshidratados y debido a su menor contenido de proteínas se prepararon 50 ml de soluciones conteniendo 10 mg producto liofilizada/ml de agua destilada. A partir de estas soluciones en forma directa o luego de ser centrifugadas (9300 x g, 20°C, 20 min.) se realizó la precipitación de las proteínas con TCA las que fueron lavadas 5 veces y resuspendidas en un volumen final de 5 ml de NaOH 0,1 N donde se determinó el contenido de proteínas-TCA y el de carbohidratos por Dubois. Los contenidos de carbohidratos y proteínas fueron expresados en porcentaje de la muestra de partida (sueros deshidratados) considerando el protocolo utilizado.

Para proteínas aisladas la cantidad de carbohidratos coprecipitados junto con las proteínas se determinó a partir de dispersiones conteniendo 10 mg proteína/ml de agua destilada. Considerando el contenido de proteína en las muestras liofilizadas, se pesó cantidad suficiente para preparar 10 ml de las dispersiones y a partir de éstas en forma directa o luego de ser centrifugadas (condiciones vistas) se precipitó la proteína con TCA, realizando los lavados y resuspendiendo en 10 ml de NaOH 0,1 N determinando el contenido de proteínas-TCA y carbohidratos.

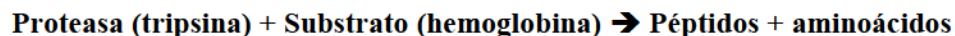
Para las PSSLC (90-180°C) (sección 2.6.2) se procedió de manera equivalente a lo detallado para proteínas aisladas preparando dispersiones acuosas (10 mg proteína/ml), determinando sobre éstas, antes y después de realizar la centrifugación (9300 x g, 20 min., 20°C) la cantidad de proteína-TCA y carbohidratos.

En todos los casos los carbohidratos coprecipitados junto a las proteínas fueron expresados como HC-P en mg carbohidratos/100 mg proteína-TCA.

### **2.8 Determinación de la actividad antitriptica**

La actividad antitriptica se determinó según el método de González y Carrillo (1987) con leves modificaciones. En este ensayo se midió la disminución en la actividad de la tripsina sobre hemoglobina desnaturalizada, debido a la adición de los sueros o proteínas aisladas.

Las reacciones involucradas en este ensayo pueden resumirse de la siguiente forma:





### **Proteasa + Substrato + Inhibidor → Proteasa-Inhibidor + Substrato**

La proteólisis se detuvo por adición de TCA y en el sobrenadante se determinó el contenido de péptidos solubles y aminoácidos liberados por la proteólisis con el reactivo de Folin Ciocalteau ( $A_{650}$ ).

Se realizó 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:

$$A_{\text{control}} - A_{\text{blanco}} = 100 \% \text{ actividad de tripsina} \quad (3)$$

$$A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}} = X \% \text{ actividad de tripsina} \quad (4)$$

$$100 - X = \% \text{ inhibición de tripsina} \quad (5)$$

La actividad antitriptica (%) se estimó como el valor relativo de % inhibición tomando como referencia al % inhibición de la muestra no tratada térmicamente, según la expresión:

$$\text{Actividad antitriptica (\%)} = 100 \times I/I_0 \quad (6)$$

Donde:  $I$  e  $I_0$  son los % de inhibición de las muestras con y sin tratamiento térmico, respectivamente.

## **2.9 Determinación del comportamiento térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Se utilizaron equipos de calorimetría diferencial de barrido modulado (MDSC) modelos Q-100 y Q-200 (*T.A. Instruments*), disponibles en el CIDCA y en la UNQ, respectivamente, analizando los datos con el software de los respectivos equipos (*T.A. Universal Analysis 2000 for Windows 2000/XP*). Los ensayos fueron realizados empleando rampas de calentamiento de 5 o 10°C/min. con las muestras colocadas en cápsulas herméticas estándar de aluminio (*T.A. Instruments*), utilizando una de estas cápsulas vacía como referencia. En todos los casos se usó  $N_2$  líquido para el enfriamiento y  $N_2$  de alta pureza

como gas de purga (caudal de 50 mL/min.). Para el caso de dispersiones acuosas se utilizaron volúmenes comprendidos entre 8 a 12  $\mu$ l (capacidad máxima de la cápsula), para el caso de muestras deshidratadas debido a su mayor densidad fue posible colocar hasta 20 mg/cápsula.

A partir de los termogramas obtenidos se determinaron las temperaturas de pico ( $T_p$ , °C) y con el trazado de la línea de base desde el inicio al final del termograma se estimó la entalpía total de desnaturalización proteica de cada muestra, expresándola por masa seca ( $\Delta H$ , J/g masa seca) y por proteína ( $\Delta H$ , J/g proteína), usando el dato del porcentaje de proteína de la muestra seca. Las determinaciones fueron realizadas al menos por duplicado. Se utilizaron como patrones proteínas de soja, purificadas y liofilizadas libres de sales: *Trypsin inhibitor Type I-S from Glycine max*; *Lectin from Glycine max* y *Trypsin-chymotrypsin inhibitor from Glycine max* (todos de Sigma) como referencias del ITK, L y ITBB, respectivamente.

### **2.9.1 Ensayos DSC sobre proteínas aisladas en solución**

Los ensayos fueron realizados con dispersiones de ASN y PSS al 30% p/p en agua destilada. Con las muestras liofilizadas se prepararon dispersiones acuosas en tubos eppendorf y se permitió la hidratación durante al menos 1 hora a 4°C. 10-12  $\mu$ l de cada dispersión fueron colocados dentro de la cápsula. Los calentamientos fueron realizados desde 20°C hasta 150°C. Las cápsulas conteniendo las muestras fueron pesadas antes y después de cada corrida para comprobar la estanqueidad del sellado. La masa de muestra seca dentro de cada cápsula fue determinada secando las cápsulas previamente pinchadas en estufa a 105°C durante 24 h.

*Estudios con mezclas ASN/PSS<sub>ac</sub> y ASN/cenizas de PSS<sub>ac</sub>*: Para estudiar las interacciones entre ASN y PSS se analizó el comportamiento térmico de mezclas de ASN con PSS nativas, desnaturalizadas, almacenadas o con sus minerales (cenizas). Para el caso de las mezclas ASN/PSS nativas, se mezclaron cantidades equivalente (1: 1 p/p, con  $\Delta$ peso < 4%) de las proteínas aisladas liofilizadas adicionando agua hasta obtener una dispersión 30% p/p. Los ensayos con PSS desnaturalizadas se realizaron tratando térmicamente en tubos eppendorf (20 min., 100°C) dispersiones acuosas de las PSS a ensayar al 15% p/p, dejando

enfriar y agregando luego cantidad de ASN liofilizada necesaria para obtener una concentración total del 30% p/p de la mezcla.

Las mezclas de ASN con cenizas de las PSS fueron realizadas como sigue: una cantidad de cenizas obtenidas equivalente a 50 mg de PSS fue mezclada con 50 mg de ASN, se agregó agua destilada (hasta obtener 30% p/p). En todos los casos una vez obtenida la mezcla final a ensayar se permitió su hidratación a 4°C.

### **2.9.2 Ensayos DSC sobre proteínas y sueros deshidratados e hidratados con contenido acuoso <70%**

Los estudios sobre SSL y PSS<sub>ac</sub> deshidratadas fueron realizados colocando la muestra en condiciones anhidras ( $\approx 20$  mg/cápsula) dentro de la cápsula. Las muestras fueron analizadas desde 20°C hasta temperaturas finales comprendidas entre 90 y 180°C.

La condición de deshidratación fue asegurada colocando las capsulas abiertas conteniendo la muestra en contacto con una atmósfera a una humedad relativa igual a cero durante 5 días. Finalizada esta etapa las cápsulas fueron inmediatamente selladas y pesadas. La masa anhidra real dentro de la cápsula se obtuvo por diferencia con la tara de la cápsula.

Para obtener muestras hidratadas con humedades relativas bajas (<20% para SSL y <15% para PSS<sub>ac</sub>) se procedió de la misma manera pero permitiendo la hidratación dentro de un desecador convencional cerrado con una humedad relativa del 75% (solución saturada de NaCl). En estas condiciones, las muestras dentro de las cápsulas abiertas se hidrataron en forma progresiva, proceso que fue controlado pesando regularmente las cápsulas hasta alcanzar el contenido de agua deseado.

Para contenidos de agua superiores se agregó la cantidad de agua requerida con una pipeta Hamilton. En todos los casos y tras sellar las cápsulas se permitió establecer el equilibrio a 4°C durante al menos 1 hora.

*2.9.2.1 DSC de SSL modelado a partir de sus componentes mayoritarios:* El SSL modelado se realizó sobre mezclas PSS<sub>ac</sub>-sacarosa (para simular el suero de soja original que contiene sacarosa como azúcar mayoritario). Para ello se prepararon mezclas de los productos liofilizados PSS<sub>ac</sub> y sacarosa en la misma proporción que la determinada en el SSL. Dicha mezcla fue disuelta en agua destilada (relación agua: mezcla liofilizada 10: 1 p/p), congelada y liofilizada antes de su análisis por DSC.

### **2.9.3 Termogramas DSC modulados**

En una serie de experimentos, los DSC fueron realizados de forma modulada (*modulated DSC technology, TA Instruments, USA*). El empleo de la calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC) reemplaza la rampa tradicional de calentamiento por un incremento oscilatorio sinusoidal de la temperatura, lo que permite que el flujo de calor pueda ser medido simultáneamente con cambios en la capacidad calorífica. La utilización de transformadas de Fourier permite separar el flujo de calor en tiempo real en una componente de capacidad calorífica y otra componente cinética. En MDSC el flujo de calor se lo denomina flujo de calor total, la capacidad calorífica es el flujo de calor reversible mientras que la componente cinética es el flujo de calor no reversible. De esta forma la señal de flujo total de calor es equivalente al flujo de calor en un DSC estándar.

Estos ensayos fueron usados para determinar: i) la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de las PSS<sub>ac</sub> y del SSL modelado en condiciones anhidras; ii) el agua congelable (AC) en el SSL con diferentes contenidos de humedad. En ambos ensayos la amplitud en la modulación de la temperatura y el período usado fue de  $\pm 0,5^\circ\text{C}$  y 50 s, respectivamente.

El análisis de la  $T_g$  fue realizado empleando una rampa de  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ . entre  $-20$  y  $200^\circ\text{C}$ . Los valores de  $T_g$  fueron obtenidas a partir de las señales “*reversing heat flow*” y “*heat capacity*” en función de la temperatura. Esta serie de ensayos fueron realizados al menos por triplicado.

La cantidad de agua congelable fue medida sobre cápsulas selladas herméticamente conteniendo SSL y diferentes cantidades de humedad (sección 2.9.2). Las corridas se realizaron según el siguiente protocolo: enfriamiento rápido ( $20^\circ/\text{min}$ .) hasta  $-50^\circ\text{C}$ ; isoterma a esta temperatura durante 20 minutos; posteriormente calentamiento hasta  $-20^\circ\text{C}$  empleando una rampa de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  (este ciclo se repitió al menos 1 vez para asegurar la cristalización del agua) y calentamiento hasta  $30^\circ\text{C}$  a  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ . Se realizó un ensayo control con agua destilada. Como referencia para el valor de entalpía de fusión se utilizó la del agua pura (Zhong y Sun., 2000). El valor de AC fue expresado como g agua congelable/g agua total en la muestra  $\times 100$ .



## **2.10 Solubilidad de proteínas en agua destilada y en buffer fosfato**

La solubilidad en agua destilada de las proteínas aisladas fue determinada preparando dispersiones acuosas 10 mg/ml mediante agitación magnética suave durante 2 h a 25°C y centrifugando luego las mismas a 9300 x g (20 min., 20°C). El contenido de proteínas soluble en el sobrenadante fue determinado por el método de Lowry (sección 2.7.3) y expresado como proteína mediante la Ec. 2. La solubilidad en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0 fue determinada a 1 y a 10 mg/ml siguiendo el mismo procedimiento que en los ensayos con agua destilada.

La solubilidad fue expresada como % p/p = (mg proteína soluble/ mg proteína total) ×100, siendo la cantidad de proteína total en la muestra ensayada determinada por el método de Kjeldahl.

## **2.11 Electroforesis de proteínas aisladas**

Las electroforesis en geles de poliacrilamida fueron realizadas según el método de Laemmli (1970) utilizando un equipo BioRad, modelo Mini Protean III.

### **2.11.1 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 1,5M (pH 8,0), TEMED 0,4% (p/v) con o sin SDS 0,4% (p/v).

Buffer de gel apilador: Tris-HCl 0,5M (pH 6,8), TEMED 0,4% (p/v) con o sin SDS al 0,4% p/v.

Buffer de muestra 2X para electroforesis disociante: Tris-HCl 0,37M (2,24 g Tris-base/50 ml finales, pH 6,8), SDS 4% p/v (2,0g/50 ml finales), glicerol 25% v/v (12,5 ml/50 ml finales), azul de bromofenol 0,1% p/v (50 mg/50 ml finales) 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.

### **2.11.2 Muestras analizadas y preparación de las mismas**

Se analizaron las proteínas de suero aisladas mediante precipitación con acetona en frío, con sulfato de amonio y los ASN. Para las proteínas no calentadas las muestras fueron disueltas directamente en el buffer de muestra 1X. Para las calentadas el tratamiento térmico se realizó en buffer fosfato de sodio a 100°C por 5 min., realizando un enfriamiento (agua-hielo) hasta alcanzar 25°C antes de agregar el buffer de muestra 2X. Para los estudios en condiciones reductoras se uso buffer de muestra con 2-ME 5% v/v. En todos los casos, previo a la siembra se centrifugó a 10000 x g durante 1 min. a temperatura ambiente para eliminar las proteínas insolubles en el buffer de muestra.

### **2.11.3 Condiciones de corrida**

Los geles preparados fueron de 1 mm de espesor, y un tamaño aproximado de 8 x 8 cm, de 10 o 12 calles en una concentración del 12% (p/v) de la solución de acrilamida-bisacrilamida, usándose concentraciones finales de TEMED y persulfato de amonio de 0,1% (v/v) y 0,035% (p/v), respectivamente. Las electroforesis se realizaron a voltaje constante (220 V) y una intensidad de corriente de 30 miliamperios por cada placa. 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 20-40 µg de proteína en un volumen de siembra  $\leq 15$  µl/calle, condiciones que responden a los lineamientos dados para electroforesis en mini-geles empleando el método de Laemmli (1970), en los que 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).

### **2.11.4 Revelado y análisis de los geles**

Una vez concluidas las corridas, los geles fueron teñidos con *Coomassie R 250* al 0,2% p/v en una mezcla etanol: agua: ácido acético (4,0: 4,0: 1,6 v/v/v) durante 12 h en bandeja

## ***Materiales y Métodos***

agitadora. La decoloración se realizó con mezcla agua: etanol: ácido acético (6,5: 2,5: 1,0 v/v/v). Se realizaron cambios de mezcla decolorante hasta tener un buen contraste entre las bandas coloreadas y el fondo. Finalmente, los geles fueron conservados en agua ligeramente acidulada con ácido acético. Se obtuvieron imágenes de los geles escaneando los mismos con un equipo *HP ScanJet 3200C* y los archivos generados fueron almacenados en formato TIFF no comprimido.

Las imágenes fueron llevadas a un tamaño y resolución adecuada usando el programa *Corel Photo-Paint 8*. Las imágenes procesadas fueron analizadas con el software *SigmaGel*, con el cual se realizó la medida de la intensidad de las bandas.

Para la estimación de los pesos moleculares (PM) de las bandas se sembró en cada gel una mezcla de patrones de PM provistas por *Pharmacia*, el cual se compone de una serie de proteínas de peso molecular conocido. Debido al PM de las muestras analizadas en este trabajo se emplearon los patrones de proteínas de baja masa molecular LMW (*Low Molecular Weight*) integrado por una mezcla de: Fosforilasa b (94,0 kDa), Albúmina Bovina (67,0 kDa), Ovoalbúmina (43,0 kDa), Anhidrasa Carbónica (30,0 kDa), Inhibidor de la Tripsina de soja (20,1 kDa) y  $\alpha$ -lactoalbúmina (14,4 kDa).

Los pesos moleculares informados para cada banda corresponden al cálculo de al menos dos geles.

### **2.12 Determinación de hidrofobicidad superficial y fluorescencia intrínseca**

La fluorescencia intrínseca (FI) así como la hidrofobicidad superficial (Ho) fueron determinadas sobre dispersiones acuosas conteniendo 1,0 mg proteína/ml. Las determinaciones se realizaron sobre las muestras tratadas como sigue: i) proteínas totales, correspondientes a dispersiones preparadas conteniendo tanto las proteínas solubles como las insolubles, preparadas por agitación magnética suave a temperatura ambiente durante 2 h; ii) proteínas totales calentadas, son las muestras i) tratadas térmicamente en un baño María a 100°C durante 5 min. y enfriadas hasta 25°C; iii) proteínas solubles, son los sobrenadantes de las muestras i) luego de ser centrifugadas a 9300 x g por 20 min. a 20°C; iv) proteínas calentadas solubles, son los sobrenadantes de las muestras ii) centrifugadas como en el puntos anterior.

## ***Materiales y Métodos***

Los espectros de FI fueron determinados a 25°C en el rango 300-400 nm a una  $\lambda_{exc}= 291$  nm utilizando un espectrofluorómetro *Aminco-Bowman Serie 2, Thermo Fisher Scientific, USA*, equipado con un portacubetas termostatzado. A partir de los espectros de emisión se determinó la ubicación del máximo de emisión ( $\lambda_{em}$ ) así como la intensidad de fluorescencia ( $I_{f_{max}}$ ).

Las medidas de hidrofobicidad superficial ( $H_o$ ), fueron realizadas empleando la sonda 1-anilino 8-naftalen sulfonato de sodio (ANS), (*Sigma Aldrich Chemical Company*) siguiendo la metodología de Kato y Nakai (Kato y Nakai, 1980; Haskard y Li-Chan, 1998). La concentración de la solución madre de ANS (20 mM) fue determinada midiendo la absorbancia usando el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) = 4950 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a 350 nm.

Previamente fueron obtenidos los espectros de excitación y emisión fluorescentes del ANS, las proteínas aisladas y sus mezclas, a fin de detectar aumentos o cambios en la intensidad de fluorescencia relativa (If). Para el sistema de estudio se determinó la  $\lambda_{exc}$  y  $\lambda_{em}$ , así como el rango de concentraciones en donde el efecto del filtro interno fue despreciable. Se determinó la IF de 3 ml de ANS 0,04 mM, y la IF tras el agregado de alícuotas (10  $\mu$ l) de dispersiones proteicas conteniendo 1,0 mg/ml de forma directa y luego de ser centrifugadas (9300 x g, 20 min., 20°C). Las determinaciones de la proteína con la sonda unida ( $IF_u$ ) así como las de la proteína sin la sonda en su correspondiente medio a la misma concentración ( $IF_p$ ), fueron determinadas a 25°C empleando una  $\lambda_{exc}$  y  $\lambda_{em}$  de 396 y 478 nm, respectivamente.

La IF neta =  $IF_u - IF_p$  fue graficada en función de la concentración de proteína; siendo  $H_o$  la pendiente inicial de este gráfico. Las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

### **2.13 Medidas de tensión superficial**

Las muestras analizadas y condiciones de preparación fueron las mismas que en las determinaciones de  $H_o$  y FI a una concentración de 1,0 mg proteína/ml como se detalló en 2.12. Las determinaciones para cada proteína y condición ensayada fue realizada por triplicado real, realizando todo el proceso (pesada, disolución magnética, tratamientos térmicos y centrifugaciones cuando correspondiese) en cada uno de los replicados. Todas las determinaciones fueron realizadas empleando un mismo lote de buffer fosfato.

Las medidas de tensión interfacial fueron realizadas empleando un equipo Lauda TVT1 (*Drop Volumen Tensiometer, Germany*) que realiza medidas de tensión superficial

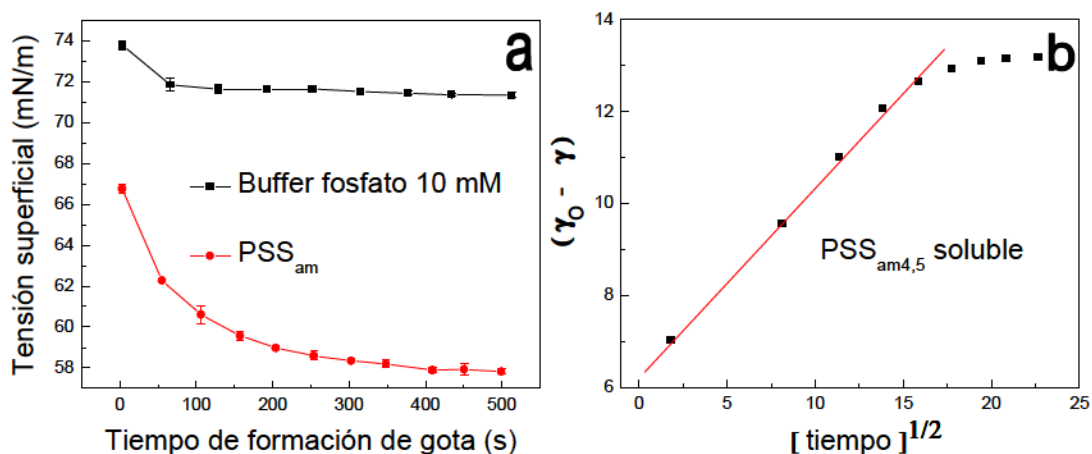


(interface aire/agua) basado en el principio de formación y caída de gotas cuando las mismas son creadas en condiciones controladas. Este principio de medida se basa en la cuantificación exacta del volumen de la gota en el momento en que la gota se separa del capilar cuando se alcanza el volumen crítico, que corresponde cuando se logra igualar la tensión superficial con el peso de la gota. El equipo brinda directamente el valor de tensión superficial ( $\gamma$ ) en mN/m. Las medidas fueron realizadas empleando el modo dinámico con las siguientes condiciones operativas: un volumen de jeringa de 2,5 ml, una temperatura de la muestra de 22°C y un número de ciclos de 3x13. Esto último significa que el equipo realizó 13 ciclos dentro del rango seleccionado de velocidad de goteo y que para cada ciclo se formaron 3 gotas a la misma velocidad.

Se trabajó en el rango de velocidad comprendido entre 0,07 – 16,21 segundos/ $\mu$ l y registrando directamente los valores medios de  $\gamma$  (mN/m) con sus desvíos estándar en función del tiempo de formación de gotas (segundos).

### 2.13.1 Determinación de la velocidad de adsorción

Por diferencia entre los valores  $\gamma_0$  y  $\gamma$  se obtuvo el parámetro  $\Delta\gamma$ , que se conoce como presión superficial. La velocidad de adsorción e la proteína en la interface fue estimada hallando la pendiente en la zona lineal al graficar entre  $\Delta\gamma$  vs  $t^{1/2}$ . Un ejemplo de dichas medidas puede verse en la Figura 4.



**Figura 4:** a) Tensión superficial (mN/m) registrada en las mismas condiciones para el buffer y una solución conteniendo 1,0 mg proteína/ml de PSS<sub>am</sub>. b) Regresión lineal entre  $\Delta\gamma = \gamma_0 - \gamma$  obtenida del gráfico a) y la raíz cuadrada del tiempo de formación de gota.  $\gamma_0$ : Tensión superficial del buffer fosfato y  $\gamma$ : Tensión superficial de la solución de proteína a cada tiempo.

### **2.13.2 Determinación de la tensión de equilibrio**

Como resultado del proceso de adsorción superficial de la proteína en la superficie de la gota en función del tiempo, la tensión superficial alcanza valores mínimos que corresponden a la tensión de equilibrio  $\gamma_e$  (mN/m) y que en las condiciones ensayadas se alcanzó en tiempos de formación de gota superiores a los 400 s (Figura 4). Para compensar posibles variaciones diarias en el funcionamiento del equipo, antes de comenzar las medidas propiamente dichas y durante el período de hidratación de las proteínas se midió la tensión superficial del buffer puro ( $\gamma_o$ ) en las mismas condiciones utilizadas luego para medir la muestra.

### **2.14 Determinación de propiedades emulsionantes**

#### **2.14.1. Preparación de emulsiones o/w**

Se prepararon emulsiones o/w con dispersiones en buffer fosfato 10 mM pH 7,0 de las diferentes proteínas aisladas y sueros, con concentraciones equivalentes de proteína. Se emplearon concentraciones de 1, 5 y 10 mg de proteína/g de buffer. Las emulsiones o/w con un  $\phi_m = 0,33$ , fueron preparadas con 10 g de dispersión acuosa y 5 g de aceite de girasol (Molinos, Argentina) por homogeneización a 20.000 rpm (1 min.,  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) con rotor S 25 N-8G conectado a un homogeneizador Ultraturax T-25 (IKA-Labortechnik, Staufen, Alemania).

Las emulsiones preparadas fueron: 1) *Emulsiones con sueros de soja y tofu*, preparadas con dispersiones acuosas de las muestras SSL, STL, STST y SSST y SSLC; 2) *Emulsiones con proteínas de suero aisladas*, empleando las muestras PST<sub>ac</sub>, PSSLC y PSS<sub>ac</sub> y PSS<sub>am</sub>; 3) Emulsiones con aislados de soja, ASN, que fueron tomadas como referencia.

#### **2.14.2 Caracterización de las emulsiones**

Sobre las emulsiones inmediatamente después de su preparación se realizaron los siguientes estudios: 1) estimación del área creada; 2) determinación de la distribución de tamaño de partículas y diámetros característicos; 3) estimación de los grados de floculación y coalescencia; 4) análisis de la desestabilización global en función del tiempo en

## ***Materiales y Métodos***

condiciones de almacenamiento estacionario y 5) estudios de separación de fases (aceite separado).

*2.14.2.1 Determinación del área interfacial creada:* La determinación del índice de actividad emulsificante (IAE), que da idea del área interfacial creada durante la formación de gotas o/w, fue realizada midiendo la absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro *Beckman DU 650* sobre emulsiones recién preparadas, las cuales fueron diluidas con buffer fosfato de sodio 10 mM conteniendo SDS 1,0 %. Se utilizaron diluciones comprendidas entre 1/20 a 1/200 v/v de forma tal que la absorbancia quede comprendida entre 0,5 y 0,9. Las determinaciones fueron realizadas al menos por quintuplicado para minimizar los errores del método. El IAE fue calculado según la siguiente expresión:

$$\text{IAE} = (4,606 \times A \times d) / (L \times \phi \times C) \quad (7)$$

Donde:

A = la absorbancia a 500 nm.

d = el factor de dilución.

L = es el camino óptico (en m).

$\phi$  = la fracción volumétrica de la fase dispersa.

C es la concentración proteica en g/m<sup>3</sup>.

*2.14.2.2 Distribución de tamaño de partícula (DTP):* Factores tales como la estabilidad a largo plazo, la apariencia y la textura están íntimamente ligados al tamaño de las gotas que contiene una emulsión. En una emulsión monodispersa el concepto de DTP carece de sentido, ya que el tamaño de las gotas esféricas puede caracterizarse de manera inequívoca a través de un solo parámetro, el radio (r) o el diámetro (D) de las gotas. Las emulsiones alimentarias son siempre poli dispersas, es decir que el tamaño de las gotas varía dentro de un rango definido entre un valor mínimo y un valor máximo y por lo tanto es conveniente utilizar las DTP.

La DTP de las diferentes emulsiones se determinó por dispersión de luz láser utilizando un analizador de partículas Malvern Mastersizer (*Malvern Instruments Limited., Worcester, Reino Unido*) modelo 2000-E acoplado a una unidad de dispersión *Hydro 2000MU*. Este equipo mide la dependencia angular en la intensidad de luz difractada de una solución diluida utilizando la teoría de Mie (Castellani y col., 2008) para obtener un análisis óptimo de la distribución de la energía de la luz. Para prevenir los efectos de la difracción múltiple

## ***Materiales y Métodos***

la emulsión es diluida antes de realizar las medidas de difracción de luz y continuamente agitada para asegurar la homogeneidad de las determinaciones. Estas condiciones de dilución y agitación son necesarias para romper los flóculos débiles entre las gotas pero no los fuertes. Las condiciones de agitación deben ser cuidadas para que se rompan los flóculos inestables o permitir la separación de gotas de aceite en gotas aisladas que puedan cuantificarse.

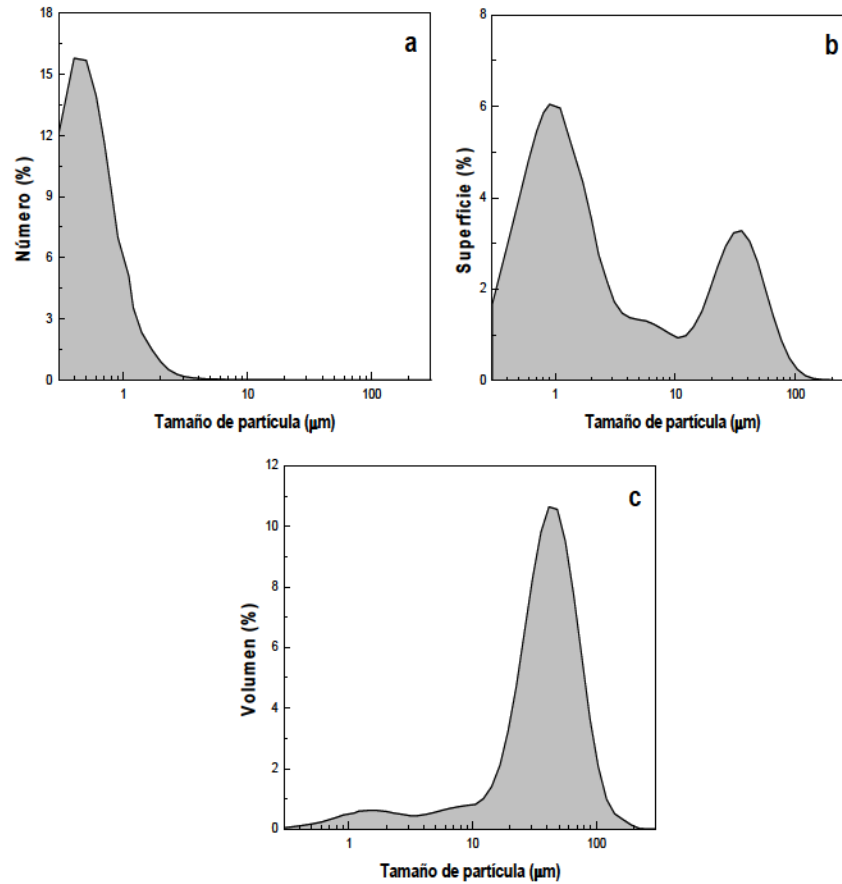
La velocidad de la unidad dispersora se seleccionó en 2000 rpm y los parámetros ópticos utilizados para la conversión del patrón de difracción angular en la correspondiente DTP fueron los siguientes: índices de refracción y de la fase dispersa: 1,33 y 1,47 respectivamente, utilizando un coeficiente de absorción: 0,001 (Palazolo y col., 2011).

Las determinaciones fueron realizadas tomando dos alícuotas de la emulsión inicial o las emulsiones sometidas a distintos tratamientos. Dichas alícuotas fueron diluidas (1/2 v/v): la primera con el mismo buffer de la fase acuosa utilizado en la preparación de la emulsión y la segunda alícuota se diluyó con buffer Tris/HCl 50 mM pH 8,0 conteniendo 0,1% SDS. Estas mezclas fueron realizadas dentro de frascos de vidrio con tapa a rosca realizando el mezclado por inversión suave para prevenir la coalescencia y asegurar en aquellas en las que se utilizó SDS la completa defloculación de la emulsión (Anton y col., 2002).

Las funciones de distribución de tamaño de partícula son monomodales cuando presentan un único pico que indica una única población, bimodales cuando presentan dos picos principales o multimodales si hay más de dos picos o población. La Figura 5 muestra un ejemplo de distribuciones en número, superficie y volumen para una emulsión o/w multimodal, en la que se puede ver que según se expresen los resultados aumenta o disminuye el peso de cada población de tamaño de partículas. En la distribución en volumen se maximiza el peso que tienen las partículas de mayor tamaño permitiendo su detección aun cuando en número sean minoritarias.

A partir de las funciones de distribución pueden calcularse distintos diámetros promedio, tales como:  $D_{1,0}$  (en número),  $D_{2,0}$  (en superficie) y  $D_{3,0}$  (en volumen), los cuales requieren el conocimiento del número total de gotas. Se puede prescindir de dicho dato mediante la utilización de los diámetro promedio de Sauter ( $D_{3,2}$ ) y de De Brouker ( $D_{4,3}$ ), cuyas fórmulas no contienen el número total de gotas. Son valores que corresponden a los promedios de las distribuciones en superficie y volumen respectivamente.  $D_{3,2}$  y  $D_{4,3}$  se conocen como “*moment diameters*” e introducen otro término lineal en el diámetro, de manera que en el numerador el término superficial tiene una dependencia con  $D^3$  y el volumen con  $D^4$  (Wasltra, 1983; Rawle, 2005).





**Figura 5:** Distribuciones de tamaño de partícula para una emulsión aceite en agua (o/w): **a)** distribución en número; **b)** distribución en superficie; **c)** distribución en volumen.

De esta forma a partir de las DTP expresadas como % volumen (%V) o como % superficie (%S) en el rango de diámetros proporcionados por el equipo se obtuvieron sus parámetros característicos expresados en  $\mu\text{m}$  cuyas definiciones están dadas en las siguientes ecuaciones:

$$D_{3,2} = \frac{\sum n_i \cdot d_i \cdot S_i}{\sum n_i \cdot S_i} = \frac{\sum n_i \cdot D_i^3}{\sum n_i \cdot D_i^2} \quad (8)$$

$$D_{4,3} = \frac{\sum n_i \cdot d_i \cdot V_i}{\sum n_i \cdot V_i} = \frac{\sum n_i \cdot D_i^4}{\sum n_i \cdot D_i^3} \quad (9)$$

*2.14.2.3 Estimación de los grados de floculación y coalescencia:* A partir de los valores de  $D_{4,3}$  se calcularon el grado de floculación final (GF%) y el grado de floculación inicial para las emulsiones recién preparadas (GF<sub>1</sub>%) empleando las siguientes expresiones:

$$GF\% = \left[ \frac{(D_{4,3} - S_{DS}) - (D_{4,3} + S_{DS})}{D_{4,3} + S_{DS}} \right] \times 100 \quad (10)$$

$$GF_i\% = [(D_{4,3\ i\ -SDS} - D_{4,3\ i\ +SDS})/D_{4,3\ i\ +SDS}] \times 100 \quad (11)$$

Donde  $D_{4,3\ -SDS}$  y  $D_{4,3\ +SDS}$  son los diámetros promedio de las emulsiones al final de un almacenamiento medidos en ausencia y presencia de SDS, respectivamente. Mientras que  $D_{4,3\ i\ -SDS}$  y  $D_{4,3\ i\ +SDS}$  son los diámetros promedio de las emulsiones inmediatamente luego de ser preparadas medidos en ausencia y presencia de SDS, respectivamente.

Con los valores  $D_{4,3}$  se determinó además el grado de coalescencia (GC%) como:

$$GC\% = [(D_{4,3} - D_{4,3\ ini})/D_{4,3\ ini}] \times 100 \quad (12)$$

Donde  $D_{4,3}$  y  $D_{4,3\ ini}$  son los diámetros promedios de las emulsiones luego del almacenamiento e iniciales medidos todos en presencia de SDS, respectivamente.

Aunque estos índices pueden también calcularse a partir del diámetro promedio de Sauter  $D_{3,2}$ , el grado de coalescencia y el de floculación se evalúa más adecuadamente utilizando el  $D_{4,3}$ . Esto es particularmente importante en las emulsiones en las que se analizan los cambios producidos debido a los procesos de congelamiento-descongelamiento; casos en los que dichos cambios son detectados con mayor sensibilidad (Relkin y Sourdet, 2005). La principal diferencia entre estos parámetros es que en el GC% se toma como referencia a la emulsión inicial y se analizan los cambios producidos en el tamaño de partícula (por coalescencia) respecto a la misma. Por otra parte el GF% refleja simplemente la variación del tamaño de partícula cuando la distribución se determina en ausencia y presencia de SDS y puede calcularse tanto para emulsiones iniciales como a las sometidas a cualquier tratamiento.

*2.14.2.4 Desestabilización de emulsiones en condiciones estacionarias:* Estos estudios fueron realizados utilizando un analizador óptico vertical (*Quick Scan, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA*) cuyo esquema se muestra en la Figura 6.

Este equipo permite medir la desestabilización global de emulsiones, suspensiones y espumas sin dilución, con tamaños de partícula entre 0,05 a 5000  $\mu\text{m}$  y una concentración de 60% v/v de fase dispersa. Las lecturas se realizan utilizando una cabeza móvil en forma de herradura que rodea una celda cilíndrica de vidrio transparente de 80 mm de largo. La emulsión se coloca dentro de esta celda que queda cerrada por la parte inferior con un

tapón de goma y por la superior con una tapa a rosca. La cabeza móvil se desplaza verticalmente impulsada por un tornillo sin fin, a lo largo de la celda. Una de las ramas de este cabezal contiene la fuente de luz que emite en la zona del infrarrojo cercano (850 nm) y trabaja de forma sincrónica con dos detectores. Uno de ellos esta ubicado en la otra rama de la herradura y recoge la radiación transmitida a través de la muestra (*Transmitancia*) y otro junto al emisor que recibe la radiación dispersada (*Backscattering*) por la muestra en una dirección de 135° respecto a la fuente (Pan y col., 2002).

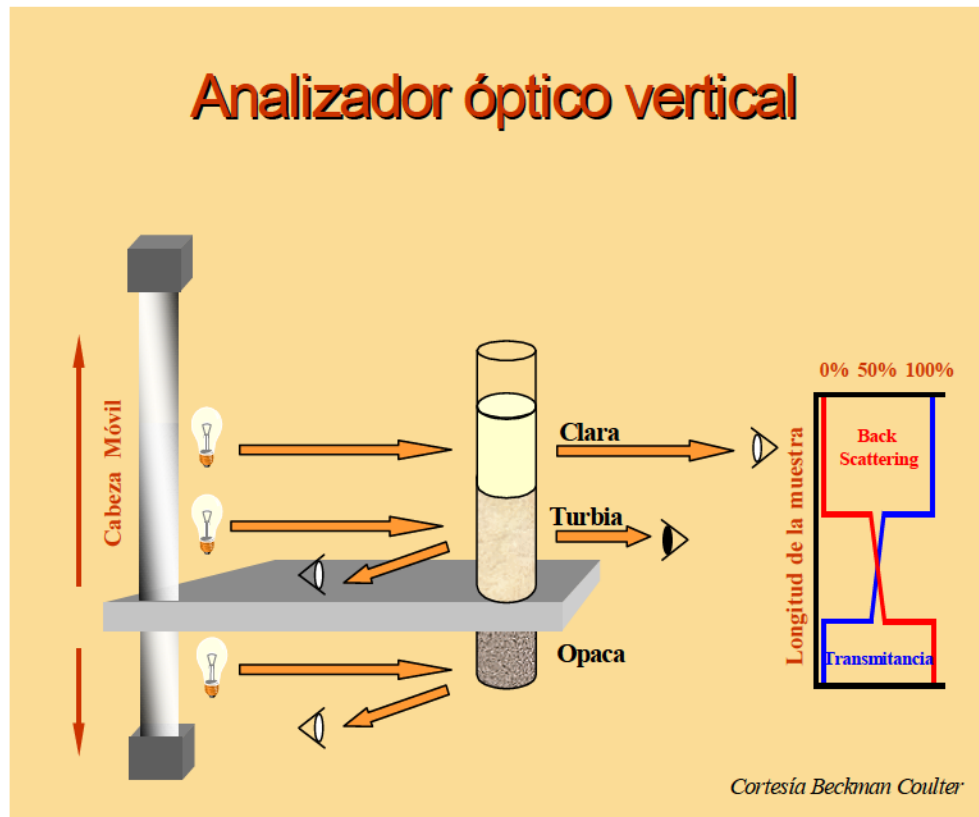


Figura 6: Esquema del funcionamiento del Analizador óptico vertical *QUICK SCAN*.

La cabeza lectora del *Quick Scan* (QS) adquiere datos porcentuales de *Transmitancia* (T%) y *Backscattering* (BS%) cada 40  $\mu\text{m}$  a lo largo de la celda y presenta los resultados mediante su software por medio de las correspondientes curvas de T% y de BS% en función de la altura del tubo. El intervalo de adquisición de datos puede programarse y los resultados son expresados en función del tiempo.

La estabilidad global de las emulsiones se analizó colocando la emulsión recién preparada dentro de la celda y registrando los perfiles de BS% y de T% en función de la altura en la

## *Materiales y Métodos*

celda en forma simultánea. Ambos perfiles fueron registrados durante 60 minutos a intervalos de 1 minuto, con una medida final a las 24 horas de almacenamiento.

*Cinética de separación gravitacional:* El proceso de desestabilización en la zona baja del tubo se debe a un empobrecimiento en gotas de aceite en esta región debido a una separación gravitacional. Este proceso de desestabilización (cremado) en las emulsiones recién preparadas se analizó estudiando los perfiles de BS% y T% en función de la altura de la emulsión en la zona baja de tubo (15-17 mm). Se utilizaron valores promedio de BS para determinar la constante cinética de separación gravitacional (K). Esta K provee información sobre la velocidad con la que se desarrolla el proceso de cremado en los estadios iniciales de separación gravitacional. Dicha constante se define por medio de la expresión:

$$K = 10^3 / (BS_{0prom} \times t_{red}) \quad (13)$$

Donde  $BS_{0prom}$  es el valor promedio inicial de BS (correspondiente al perfil inicial, a  $t = 0$  min) y  $t_{red}$  es el tiempo de reducción del BS hasta un cierto porcentaje del valor  $BS_{0prom}$ . Esta expresión fue definida por Márquez y col. (2005) al emplear un QS para cuantificar la estabilidad de emulsiones tipo cremas preparadas con leche de soja. En nuestros ensayos se utilizó un  $t_{red} = t_{0,5}$  que es el tiempo necesario para obtener una reducción del 50%.

*Estudio de la fase crema:* El porcentaje de la fase crema (FC%) se determinó a las 24 h a un valor de BS% = 30% mediante la expresión:

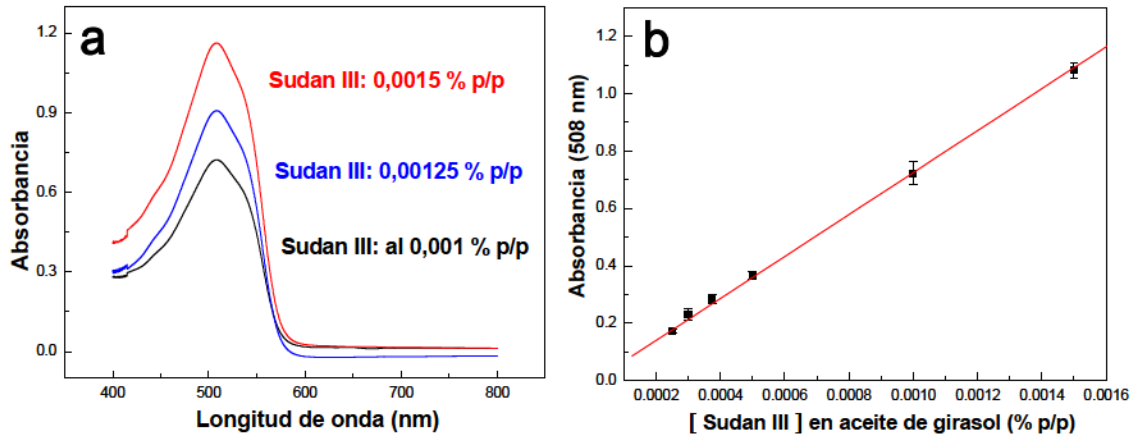
$$FC\% = (A_c/A_e) \times 100 \quad (14)$$

Donde  $A_c$  es la altura de la fase crema, en tanto que  $A_e$  es la altura de la emulsión inicial; en ambos casos dichas alturas están expresadas en mm.

*Efecto de la floculación:* Para analizar si la cinética de cremado estaba influenciada por la presencia de flóculos, se prepararon las emulsiones de forma habitual agregándose inmediatamente luego de su preparación 150  $\mu$ m de buffer de muestra conteniendo SDS 10,0 p/v (0,1% p/p final en la fase acuosa). Se utilizó este buffer para poder disociar los flóculos antes de la corrida, sin afectar la concentración de los demás componentes de la emulsión preparada (sección 2.14.1).



2.14.2.5 *Determinación de aceite separado (AS%)*: fue realizada siguiendo el procedimiento experimental conocido como método de dilución del colorante con leves modificaciones (Thanasukarn y col., 2004a). que emplea el colorante lipofílico Sudan III (*Solvent Red 23*), que exhibe una absorbancia máxima a 508 nm (Figura 7a).



**Figura 7:** a) Barridos de longitud de onda de soluciones de Sudan III en aceite de girasol con su característico máximo ubicado a 508 nm. b) Rango de respuesta lineal del Sudan III en aceite de girasol; las medidas se realizaron a 508 nm en un rango comprendido entre  $2,5 \times 10^{-4}$  y  $1,5 \times 10^{-3}$ .

El principio del método consiste en que el aceite separado de una emulsión desestabilizada puede ser cuantificado al ser mezclada con aceite conteniendo el colorante. La absorbancia del aceite coloreado se reduce por la dilución generada por el aceite separado. Se preparó una solución madre de Sudan III en aceite de girasol refinado (0,015% p/p) por agitación magnética (4°C, 24 h). A partir de esta solución madre se prepararon mediante dilución con aceite refinado de girasol soluciones de menor concentración, incluida la utilizada en los ensayos (0,001% p/p). Se determinó el rango de linealidad entre la absorbancia y la concentración del colorante en aceite de girasol. En la Figura 7b puede verse que la absorbancia a 508 nm ( $A_{508}$ ) exhibe una dependencia lineal con la concentración del colorante en el rango de concentración 0 – 0,001 % p/p, de acuerdo con la Ley de Lambert-Beer, resultando la expresión:

$$A_{508} = 730,6535 \times C_{\text{Sudan III}} - 0,0051 \quad (r = 0,9991) \quad (15)$$

Donde  $C_{\text{Sudan III}}$  es la concentración de Sudan III en aceite de girasol.

## ***Materiales y Métodos***

*Protocolo seguido para cuantificar AS:* a) Mezclar 8 g de emulsión problema con 2 g de solución de Sudan III al 0,001% p/p en tubos de centrifuga plásticos. Mezclar por inversión suave y seguidamente incubar durante 60 min. a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  a fin de favorecer la separación del aceite; b) Realizar una centrifugación a baja velocidad (5 min., 250 g a  $20^\circ\text{C}$ ) para permitir la separación de la capa del aceite coloreado de la emulsión problema (fase inferior) minimizando la coalescencia de la emulsión (Thanasukarn y col., 2004a); c) Retirar una alícuota de aproximadamente 1,5 ml del aceite coloreado en un tubo eppendorf y centrifugar ( $14.000 \times g$ , 15 min.,  $20^\circ\text{C}$ ) para eliminar trazas de emulsión que puedan afectar la medida espectrofotométrica ya que los que se quiere medir a 508 nm es la dilución del aceite con el Sudan III debido al aceite separado de la emulsión. Se realizaron las determinaciones utilizando aceite refinado de girasol como blanco; d) La fracción en masa del aceite no emulsificado o AS% se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$\text{AS\%} = m_o \times (A - 1) / (m_e \times \phi_m) \quad (16)$$

Donde:

$m_o$ : Masa de solución de colorante agregado (2 g).

A: Relación de las absorbancias a 508 nm del aceite coloreado antes y después del proceso de extracción. Notar que si la emulsión separa aceite, este aceite separado se mezclará con el aceite teñido con el sudan III bajando en consecuencia la DO a 508 nm, por tanto:

$A = A_{580} \text{ colorante puro} / A_{580} \text{ colorante diluido} > 1$ .

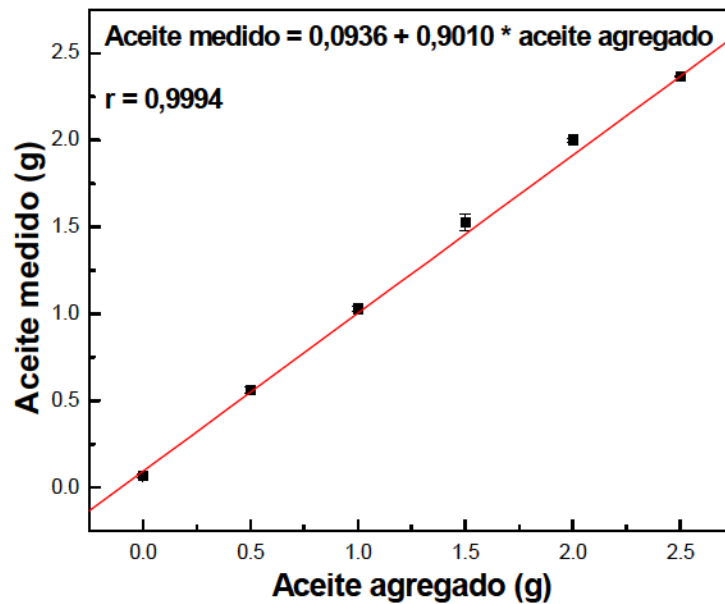
$m_e$ : Masa de la emulsión (8 g).

$\phi_m$ : Fracción en masa del aceite en la emulsión.

*Verificación de la validez del método:* La aplicabilidad y exactitud del método depende del grado de correlación entre el aceite libre (agregado a la emulsión) y el cuantificado al utilizar esta técnica. Para ello se determinó el AS% de la forma detallada sobre emulsiones preparadas con ASN al 1,0% (que no libera aceite) con agregado de cantidades conocidas de aceite libre.

Se realizaron ensayos sobre 6 emulsiones por triplicado, a una de ellas no se le agregó aceite y a las restantes se les adicioné cantidades conocidas de aceite hasta alcanzar el contenido total de aceite utilizado en la preparación de la emulsión. Estas emulsiones

fueron preparadas de manera independiente (incluyendo pesada de la proteína aislada, dispersión magnética en el buffer, agregado del aceite y homogeneización).



**Figura 8:** Aceite cuantificado mediante el método de dilución del colorante en emulsiones estabilizadas con ASN con y sin agregado de aceite libre en función del aceite agregado en las mismas.

Una correlación lineal (Figura 8) fue hallada entre el aceite cuantificado por el método y el aceite agregado a cada una de las emulsiones.

$$\text{Aceite medido} = 0,9010 \times \text{Aceite agregado a la emulsión} - 0,0936 \quad (r = 0,9994) \quad (17)$$

Estos ensayos permitieron comprobar que: i) el aceite medido empleando esta metodología es igual al aceite libre agregado; ii) hay ausencia de interacciones o interferencias entre el colorante y los componentes de la emulsión, iii) esta metodología es aplicable para determinar el aceite separado en emulsiones.

### 2.15 Estudios de crioprotección de emulsiones congeladas

Debido al alto contenido de carbohidratos presentes en los sueros de soja y de tofu, se analizó el poder crioprotector de los mismos sobre emulsiones que presentan cierto grado (alto o bajo) de desestabilización al ser congeladas. Se emplearon como crioprotectores los sueros deshidratados (SSL y STST) en forma comparativa con un azúcar de referencia. Se

## ***Materiales y Métodos***

evaluó su acción crioprotectora sobre emulsiones o/w preparadas con dispersiones acuosas al 2% p/p de ASN o caseinato de sodio (CS) como fase acuosa. El caseinato utilizado fue adquirido a Sigma Aldrich (*St. Louis, USA*) y se utilizó sin purificación previa; su contenido de proteína cruda fue del  $90,4 \pm 0,33\%$  (% p/p, N×6,38). Las dispersiones proteicas fueron preparadas en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0 mediante agitación magnética suave a temperatura ambiente durante 5 h.

Las emulsiones o/w se prepararon con bajo tamaño de partícula para poder evaluar tanto el efecto desestabilizante de la congelación como el de crioprotección ejercido por los sueros. Estas emulsiones se prepararon en dos etapas: 1<sup>ra</sup>) Emulsión primaria: homogeneizando la dispersión proteica con aceite refinado de girasol (Molinos, Argentina) con un  $\phi_m = 0,33$ , utilizando un Ultraturrax T-25 con rotor S 25 N-10G (20.000 rpm, 1 min.); 2<sup>da</sup>) Emulsión secundaria: homogeneizando la emulsión primaria con un homogeneizador a válvula de alta presión (equipo *Panda 2K, GEA Niro Soavi, Parma, Italia*), con una presión de 400 y 40 bar en la primera y segunda válvula, respectivamente. Se descartaron los primeros 150-200 ml y se realizó un total de tres circulaciones para asegurar una correcta homogeneización.

### **2.15.1 Estudios a corto tiempo de almacenamiento congelado**

Se realizaron ensayos de almacenamiento congelado (-18°C) durante 28 días sobre emulsiones. En estos estudios preliminares a corto plazo se analizó el nivel de crioprotección ejercido por STST o SSL a concentraciones de 1,0 o 5,0% p/p en las emulsiones finales de ASN o CS. Se realizaron ensayos comparativos utilizando cantidades de sacarosa equivalentes a los aportados por los respectivos sueros deshidratados en los diferentes niveles ensayados.

Los controles con sacarosa fueron preparados considerando que 1/3 p/p del STST son glúcidos, mientras que la mitad del SSL corresponde a carbohidratos con posible poder crioprotector. En todos los casos los crioprotectores fueron dispersados por agitación magnética a temperatura ambiente durante 2 h en cantidad de buffer fosfato 0,1 M conteniendo azida sódica al 0,03% p/v suficiente para llegar a 10 g finales, de manera de obtener dispersiones al 2,0 y 10,0% p/p, respectivamente. Previo a la congelación, las emulsiones se diluyeron a la mitad ( $\phi_m$  final = 0,165) con: i) buffer fosfato de sodio 0,1 M (control); ii) buffer conteniendo 2,0 y 10,0% p/p de STST o SSL para obtener los niveles de 1,0 y 5,0% en la emulsión final y iii) con buffer conteniendo niveles equivalentes de



## ***Materiales y Métodos***

sacarosa a los aportados por SSL y STST, realizando luego un mezclado suave por inversión hasta total homogeneización del sistema.

Finalmente, las emulsiones resultantes, colocadas en frascos plásticos (30 x 60 mm) con tapa se congelaron en un freezer convencional -sin convección forzada- a  $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , dispuestas sobre bandejas plásticas y en forma equidistante para una congelación homogénea.

El descongelamiento de las emulsiones se realizó retirando “un lote completo de emulsiones” y permitiendo su descongelamiento en condiciones estáticas a temperatura ambiente. En cada oportunidad se descongelaron lotes de 18 frascos, 9 correspondientes a las emulsiones preparadas con ASN y otros 9 a las emulsiones estabilizadas con CS. Cada lote de frascos contó con un control (sin crioprotector) y 8 frascos correspondientes a los 2 sueros deshidratados ensayados a los 2 niveles y sus correspondientes controles de sacarosa.

*2.15.1.1 Evaluación del grado de crioprotección en emulsiones:* Sobre las emulsiones iniciales (no congeladas) y las mismas emulsiones descongeladas luego de diferentes tiempos de almacenamiento a  $-18^{\circ}\text{C}$ , se realizaron las siguientes determinaciones:

*Altura relativa de la fase crema:* Se realizó la medida sobre un fondo blanco con una regla milimetrada y se tomó nota de la altura en mm de la fase crema en relación a la altura total de la emulsión.

*Fotografías macroscópicas de las emulsiones:* Se realizó un registro fotográfico en alta resolución de la apariencia de las diferentes emulsiones. Se utilizó una cámara Kodak *Easy Share*, Modelo 8.7 *Megapixeles*, colocando los frascos sobre una plataforma especial y delante de un telón de fondo negro, empleando el modo autorretrato y la función disparador automático para evitar movimiento durante la captura.

*Distribución de tamaño de partícula y grados de desestabilización:* Por dispersión láser se determinó al menos sobre dos alícuotas independientes la DTP expresada en % volumen en presencia y ausencia de SDS como se describió en 2.14.2.2.

*Los grados de floculación y coalescencia:* De las emulsiones descongeladas se estimaron según se describió en 2.14.2.3.

*Microscopía de las emulsiones:* Se analizaron las emulsiones con los mayores niveles de crioprotector ensayado. La microestructura de estas emulsiones se estudió colocando entre porta y cubreobjetos 1 gota de emulsiones diluidas 1/10 v/v con buffer 0,1 M sin SDS o con buffer conteniendo 1,0% p/v de SDS. Dichas diluciones fueron realizadas dentro de

## ***Materiales y Métodos***

tubos eppendorf, realizando una suave mezcla por inversión. Se utilizó un microscopio óptico con un aumento de 400X y se registraron las imágenes utilizando una cámara *Canon Power Shot A570 IS de 7,1 Megapíxeles*.

*Cuantificación de aceite separado:* Las determinaciones de AS% fueron realizadas como en 2.14.2.5. Cuando fue posible, de cada frasco de emulsión descongelada se muestreó por duplicado 8 g de emulsión para la determinación de AS%.

### **2.15.2 Estudios a tiempos largos de almacenamiento congelado**

Los ensayos a largo plazo (máximo 130 días a  $-18^{\circ}\text{C}$ ) se realizaron para profundizar los estudios sobre las emulsiones que presentaron la menor estabilidad frente al congelamiento y una alta tendencia a la floculación en los ensayos a corto plazo. Para probar la capacidad crioprotectora de STST y el SSL se incluyeron ensayos con menores cantidades de crioprotector. En estos estudios se probó el poder crioprotector sobre emulsiones preparadas con ASN 2% y se registraron las historias térmicas de las mismas durante el proceso de congelación y su posterior almacenamiento congelado empleando un equipo *datalogger Lufft Opus C-10 (Lufft, Meß und Regeltechnik, Fellbach, Germany)* y analizando los datos con el software (*SmartGraph V3.7, Fellbach, Germany*). Se usaron termocuplas K (de 1 mm de diámetro) ubicadas tanto en el centro como en la periferia de los frascos. La tasa de enfriamiento fue aproximadamente de  $1,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . desde  $22^{\circ}\text{C}$  hasta  $0^{\circ}\text{C}$ .

*2.15.2.1 Diseño experimental de los ensayos de crioprotección a largo plazo:* Se prepararon 8 lotes por duplicado de 13 frascos cada uno; 1 lote como control (sin congelar) y 7 para cada tiempo de almacenamiento. Cada lote fue integrado por: i) 3 frascos: emulsión con STST al 5,0; 1,0 y 0,2% p/p en la emulsión final; ii) 3 frascos: controles para i) conteniendo 1,667; 0,333 y 0,067% p/p de sacarosa en la emulsión final; iii) 3 frascos: emulsión con STL al 5,0; 1,0 y 0,2% p/p en la emulsión final; iv) 3 frascos: controles para iii) conteniendo 2,5; 0,5 y 0,1% p/p de sacarosa en la emulsión final; v) 1 frasco control conteniendo 10 g de emulsión preparada con ASN con 10 g de buffer fosfato 0,1 M, sin agregados de crioprotectores. Cada lote de emulsiones fue congelado a  $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y se analizaron los cambios durante el almacenamiento en estado congelado retirando muestras a los 1,5 días (40 horas) y 7, 16, 30, 42, 60 y 130 días.

## ***Materiales y Métodos***

Las emulsiones descongeladas fueron analizadas como se indicó en 2.15.1.1 para evaluar el grado de desestabilización con los distintos crioprotectores en comparación con la emulsión control (sin crioprotector) y la emulsión inicial (no congelada).

**2.16 Análisis estadístico:** Los datos fueron analizados empleando análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias significativas entre los diferentes valores fueron analizadas empleando el test de Fisher. Se utilizó el *software Stargraphics Plus 4.0*. Se utilizó un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . Las determinaciones fueron expresadas con los valores medios con las desviaciones estándar.

**RESULTADOS**

*y*

**DISCUSIÓN**



### **3. Composición de sueros y proteínas aisladas**

### **3.1 Composición de sueros de soja y tofu, líquidos y secados**

Se analizó la composición del suero de soja (SS) preparado en el laboratorio (sección 2.1) y del suero de tofu (ST) proveniente de la preparación industrial del tofu.

La cantidad de lípidos hallada en el ST fue de  $0,0236 \pm 0,0003\%$  p/v, por el contrario en el SS no se detectaron lípidos. Estos resultados concuerdan con la materia prima de partida y el proceso de obtención de cada suero. La ausencia de lípidos detectables en el SS puede atribuirse a que la harina de partida es desgrasada, aunque la harina aún contiene un remanente de grasa declarado por el fabricante como  $<1,0\%$ . Por otra parte para el proceso de obtención del tofu se parte de porotos enteros con un contenido de lípidos del 20% (Tabla 1), el bajo contenido de lípidos hallado en el ST puede atribuirse al mayor grado de dilución de este suero y sugiere que la mayor parte de los lípidos extraídos del poroto quedan en el tofu.

Las determinaciones de densidad y extracto seco (ES) permiten establecer que el ST es un suero más diluido que el SS. La densidad y ES son  $1020 \pm 5$  g/l y  $3,21 \pm 0,18\%$  p/p para el SS, mientras que para el ST registran valores de  $1012 \pm 3$  g/l y  $2,09 \pm 0,03\%$  p/p respectivamente.

Mientras que el SS es obtenido en condiciones estandarizadas, el ST proviene de las diferentes industrias de elaboración del tofu siendo en consecuencia un suero con una mayor variabilidad. Por ejemplo el ST de la industria oriental utilizado por Yuwono y Kokugan (2008) es más diluido respecto al nuestro con un ES de  $1,1\%$  p/v, el cual se distribuye en:  $0,5\%$  de extracto libre de nitrógeno;  $0,2\%$  de proteína;  $0,2\%$  de minerales;  $0,1\%$  de lípidos y  $0,1\%$  de fibra cruda. Por el contrario otros ST resultan más concentrados, por ejemplo el proveniente de la industria Española presenta un ES de  $2,46 \pm 0,01\%$  p/v (Tenorio y col., 2010), mientras que el ST empleado por Ben Ounis y col. (2008) presenta un ES de  $3,6\%$  p/p el cual se distribuye en:  $2,23\%$  de extracto libre de nitrógeno;  $0,5\%$  de proteína total;  $0,43\%$  de minerales y  $0,44\%$  de lípidos con un pH comprendido entre 5,10 y 5,20.

En la Tabla 7 se presentan los contenidos de proteína (Kjeldahl,  $N \times 6,25$ ) y aquella precipitada con TCA (Proteína-TCA), carbohidratos totales, cenizas y calcio hallados en los sueros líquidos y deshidratados. La mayor densidad y ES del SS puede atribuirse a contenidos significativamente mayores de carbohidratos y proteína que resultan ser los componentes mayoritarios en estos sueros ( $p < 0,05$ ; Tabla 7).

## *Composición de sueros y proteínas aisladas*

En contraste, el contenido de cenizas del ST es significativamente mayor al del SS ( $p < 0,05$ ; Tabla 7). Los minerales hallados en el SS provienen principalmente de los reactivos utilizados en su obtención en las etapas de ajustes de pH, mientras que en el ST además se utiliza calcio como agente precipitante pudiendo quedar parte de este en el suero. Los contenidos de proteína y carbohidratos totales del suero de soja liofilizado (SSL) son significativamente mayores que los del suero de tofu liofilizado (STL), en tanto que la cantidad de ceniza del STL resulta significativamente mayor que la del SSL ( $p < 0,05$ ; Tabla 7). El contenido de calcio hallado en el STL es  $\approx 18$  veces mayor que el hallado en el SSL, confirmando que parte del calcio agregado durante la elaboración del tofu pasa al ST.

**Tabla 7:** Composición de sueros utilizados en este trabajo. Proteína: Proteína (Kjeldahl,  $N \times 6,25$ ). Proteína-<sub>TCA</sub>: Proteína precipitada con TCA. SS: Suero de soja. ST: Suero de tofu. SSL: Suero de soja liofilizado. SSST: Suero de soja secado térmicamente. STL: Suero de tofu liofilizado. STST: Suero de tofu secado térmicamente. n.d.: No determinado.

Sueros Líquidos	Proteína (g/l)	Proteína- <sub>TCA</sub> (g/l)	Carbohidratos (g/l)	Ceniza (g/l)	Ca (% p/p)
SS	$5,34 \pm 0,08^a$	$2,93 \pm 0,35^a$	$17,27 \pm 0,43^a$	$4,39 \pm 0,03^a$	n. d.
ST	$4,62 \pm 0,14^b$	$2,23 \pm 0,36^a$	$8,77 \pm 0,38^b$	$5,14 \pm 0,01^b$	n. d.

Sueros secados	Proteína (% p/p)	Proteína- <sub>TCA</sub> (% p/p)	Carbohidratos (% p/p)	Ceniza (% p/p)	Ca (% p/p)
SSL	$16,29 \pm 0,01^c$	$10,15 \pm 0,53^b$	$68,04 \pm 2,76^c$	$13,80 \pm 0,30^c$	$0,19 \pm 0,06^a$
SSST	$16,35 \pm 0,08^c$	n. d.	$69,17 \pm 0,33^c$	$14,07 \pm 0,25^c$	$0,31 \pm 0,07^a$
STL	$15,31 \pm 0,18^d$	$10,27 \pm 0,75^b$	$37,22 \pm 1,16^d$	$16,67 \pm 0,03^d$	$3,39 \pm 0,01^b$
STST	$15,55 \pm 0,08^d$	n. d.	$38,57 \pm 3,11^d$	$16,45 \pm 0,25^d$	$3,25 \pm 0,16^b$

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Espinosa-Martos y col. (2006) analizaron la composición de un suero de tofu derivado de una industria local. Los valores hallados para HC totales fueron  $8,21 \pm 0,05$  g/l siendo el 40% oligosacáridos (97% estaquiosa y 3% inulina) compuestos prebióticos saludables y el 60% restante azúcares solubles. Los contenidos de proteína ( $N \times 6,25$ ), fibra soluble y ceniza fueron de  $5,30 \pm 0,05$ ;  $0,58 \pm 0,05$  y  $0,14 \pm 0,01$  g/l respectivamente. Las diferencias halladas con nuestros resultados pueden atribuirse a diferencias en las materias primas así como en su obtención. La cuantificación por HPLC de los azúcares solubles

## *Composición de sueros y proteínas aisladas*

mostró que la sacarosa es el azúcar más abundante, dato que nosotros habíamos hallado para SSL por TLC (datos no mostrados). Estos autores hallaron que sacarosa y estaquiosa representan el 53 y 39% de los azúcares solubles respectivamente, con cantidades apreciables de glucosa (4%), xilosa (2%), inulina (1%) y fructosa (1%).

Para el caso de los sueros liofilizados la cantidad de proteína-TCA es aproximadamente 2/3 del contenido de proteína determinado por Kjeldahl (Tabla 7). Por diferencia entre los contenidos de proteína y proteína-TCA puede obtenerse el contenido de nitrógeno no proteico que da cuenta del material nitrogenado cuantificado por Kjeldahl y la proteína precipitada con TCA la que fue sometida a un proceso de lavado (sección 2.7.3).

Como es esperable, la comparación entre los niveles de proteína, carbohidratos, cenizas y calcio entre SSL y el suero de soja secado térmicamente (SSST) y entre STL y el suero de tofu secado térmicamente (STST) indican que la liofilización o la deshidratación térmica de los sueros no afectan las relaciones entre estos componentes. Cabe destacar que, estas dos últimas muestras tienen niveles comparables y significativamente menores de proteínas y carbohidratos respecto a SSL y SSST ( $p < 0,05$ ; Tabla 7). Por el contrario, los niveles de ceniza y calcio de STL y STST son significativamente mayores que los hallados en SSL y SSST tal y como sucede en los sueros de partida.

El secado es una estrategia que puede ayudar a reducir el impacto ambiental de estos sueros que, de no ser adecuadamente tratados, se transformarían en efluentes muy contaminantes debido a su alta demanda de oxígeno. Liu y col. (2013) hallaron que durante la producción de ASN se generan grandes cantidades de SS (pH: 4,3) el cual contiene de 4,0 g/l de proteína y 0,4 g/l de isoflavonas. Estos últimos autores trabajaron en la recuperación de las isoflavonas reduciendo el impacto ambiental del SS cuya demanda de oxígeno es de 10000 mg/l. El secado a la vez que simplifica la manipulación, permite explorar el posible aprovechamiento de subproductos que aún contienen componentes valiosos.

Espinosa-Martos y col. (2006) liofilizaron ST y hallaron por HPLC que el contenido de isoflavonas es  $\approx 0,8\%$  p/p en el STL.

Más recientemente Matemu y col. (2012) señalaron que actualmente el ST representa un problema grave en cuanto al manejo debido a las grandes cantidades generadas cada día y a su poder contaminante. Estos autores señalaron que el ST pese a tener componentes benéficos (proteínas, oligosacáridos e isoflavonas) también tienen otros componentes con actividad biológica indeseable como las saponinas y el ácido fítico que deben ser



## Composición de sueros y proteínas aisladas

removidos o modificados para posibilitar la utilización del ST como un ingrediente funcional para la industria alimentaria.

### 3.1.1 Carbohidratos coprecipitados en proteína de sueros deshidratados

El alto grado de dilución de los líquidos de partida ( $ES < 3,5\%$ ) determina que la precipitación de proteína con TCA sea realizada a partir de los sueros deshidratados. Para ello se procedió como en 2.7.5 preparando dispersiones acuosas a partir de las cuales en forma directa o luego de separar las proteínas insolubles se precipita la proteína con TCA, la cual es lavada y resuspendida determinándose la cantidad carbohidratos y proteína-TCA. Los resultados de estas determinaciones se hallan en la Tabla 8.

**Tabla 8:** Contenidos de proteínas y carbohidratos en muestras de sueros antes y después de la eliminación de proteínas insolubles por centrifugación. HC-P<sub>TCA</sub>: mg carbohidratos coprecipitados /100 mg proteína-TCA. Los contenidos de proteína y carbohidratos fueron expresados en porcentaje de los sueros de partida.

Muestra	Total		HC-P <sub>TCA</sub> Total	Soluble (9300 x g, 20 min., 20°C)		HC-P <sub>TCA</sub> Soluble
	Carbohidratos (% p/p)	Proteína-TCA (% p/p)		Carbohidratos (% p/p)	Proteína-TCA (% p/p)	
SSL	0,292 ± 0,015	9,43 ± 0,47	3,10 ± 0,31 <sup>a</sup>	0,315 ± 0,015	7,97 ± 0,39	3,95 ± 1,05 <sup>a</sup>
SSST	1,007 ± 0,049	9,02 ± 0,36	11,16 ± 0,84 <sup>b</sup>	0,811 ± 0,040	6,65 ± 0,32	12,19 ± 0,27 <sup>b</sup>
STL	0,907 ± 0,042	10,07 ± 0,58	9,01 ± 0,59 <sup>c</sup>	0,811 ± 0,040	7,07 ± 0,35	11,47 ± 0,37 <sup>c</sup>
STST	0,862 ± 0,042	9,40 ± 0,33	9,17 ± 0,76 <sup>c</sup>	0,662 ± 0,033	6,63 ± 0,32	9,98 ± 1,16 <sup>c</sup>

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

La glicosilación de una proteína implica la formación de una unión covalente entre un azúcar y una proteína, dicha reacción se ve favorecida en condiciones de baja humedad y altas temperaturas como las encontradas cuando el suero deshidratado es calentado en ausencia de agua (Morgan y col., 1997; Chevalier y col., 2001; Oliver y col., 2006 y Oliver, 2011).

Usualmente la glicosilación se determina cuantificando algún compuesto estable de la reacción de Maillard, como la furosina que se genera tras una hidrólisis ácida del producto de Amadori lactulosil-lisina o fructosil-lisina Guerra-Hernandez y col. (1999).

En este trabajo utilizaremos el parámetro HC-P<sub>TCA</sub> para cuantificar los carbohidratos que precipitan con TCA junto a las proteínas y no son removidos tras un exhaustivo proceso

## *Composición de sueros y proteínas aisladas*

que consta de 5 resuspensiones-lavados con TCA al 12% con sus respectivas centrifugaciones, pudiendo estar o no formando proteínas glicosiladas.

Como los contenidos de carbohidratos y proteínas-TCA en la Tabla 8 están expresados de manera porcentual respecto de las muestras de partida (sueros deshidratados) podemos realizar una comparación con los datos de la Tabla 7. Las cantidades de proteína-TCA determinada en estos ensayos son el 93 y 98% de la hallada en forma directa en el SSL y STL respectivamente. Estos resultados confirman los contenidos de proteína-TCA en los sueros deshidratados pudiendo atribuirse las diferencias a pérdidas de proteína durante las sucesivas etapas de precipitación, resuspensión y centrifugación así también como a errores experimentales.

A diferencia de las determinaciones de proteína en donde se cuantifica prácticamente la totalidad de la proteína originalmente hallada en los sueros de partida, se encuentran notables diferencias en la determinación de carbohidratos. Por ejemplo el contenido de carbohidratos en SSL y SSST se encuentra entre el 68-69% p/p (Tabla 7), mientras que los porcentajes de carbohidratos que quedan unidos a la proteína-TCA son 3,1 y 11,2 para SSL y SSST respectivamente. Estos resultados indican que la mayor parte de los azúcares que forman parte de los sueros pueden ser eliminados mediante lavados.

La estimación de HC-P<sub>TCA</sub> será de utilidad posteriormente para determinar si estos carbohidratos no eliminables mediante lavados tienen algún efecto sobre las propiedades físico-químicas o funcionales de las proteínas.

*Sin centrifugación:* El parámetro HC-P<sub>TCA</sub> de las proteínas precipitadas con TCA desde SSL es significativamente menor respecto al valor hallado para STL ( $p < 0,05$ ; Tabla 8).

Dado que los contenidos de proteína-TCA entre SSL y STL son comparables, mientras que la cantidad de carbohidratos hallada en el SSL es 1,8 veces mayor respecto a STL (Tabla 7), resulta evidente que los tratamientos térmicos aplicados al ST antes de la liofilización es el factor que más influye en el parámetro HC-P<sub>TCA</sub>. La mayor intensidad de los tratamientos térmicos aplicados para obtener el ST del que se aísla PST<sub>ac-5,5</sub> determina que una mayor cantidad de carbohidratos co-precipiten con las proteínas siendo este factor más importante incluso que el contenido de azúcares en el suero de partida.

Si bien es cierto que el proceso de liofilización es un secado no térmico, a lo largo del trabajo se halló que las proteínas aisladas a partir de los sueros liofilizados tienen mayores valores para el parámetro HC-P<sub>TCA</sub> que cuando las proteínas son aisladas en forma directa desde los sueros líquidos. Cabe mencionar que la liofilización incluye una etapa previa de

## *Composición de sueros y proteínas aisladas*

congelación en donde los componentes mayoritarios (proteínas y carbohidratos) se concentran debido a la congelación (crio-concentración). Durante esta etapa hay una mayor interacción entre estos componentes y por lo tanto una mayor posibilidad que el parámetro HC-P<sub>TCA</sub> aumente.

La importancia del tratamiento térmico en el parámetro HC-P<sub>TCA</sub> se evidencia al comparar las proteínas aisladas desde SSL respecto de SSST, ambos sueros obtenidos desde SS mediante liofilización y secado térmico en el laboratorio respectivamente. El HC-P<sub>TCA</sub> de las proteínas aisladas desde SSST es 3,6 veces mayor respecto a SSL ( $p < 0,05$ ; Tabla 8), resultado que se atribuye al secado térmico del SS realizado en el laboratorio. Si bien este secado fue realizado a baja temperatura ( $\leq 50^{\circ}\text{C}$ ) el mismo comenzó con una etapa de concentración-secado de 5 h y tuvo una duración superior a las 2 semanas incluyendo los procesos de secado secundario (sección 2.2), tiempo durante el cual se propició la interacción entre las proteínas y los HC.

*Con centrifugación:* El proceso de centrifugación (eliminación de proteínas insolubles) previo a la precipitación con TCA del sobrenadante, aumentó el parámetro HC-P<sub>TCA</sub> en 18,2% en promedio para las proteínas aisladas de todos los sueros (Tabla 8). El aumento en HC-P<sub>TCA</sub> sugiere que la centrifugación separa a las proteínas con menor interacción con HC, quedando en el sobrenadante las proteínas más solubles debido a su mayor contenido de carbohidratos. El orden con que aumentó HC-P<sub>TCA</sub> continuó siendo  $\text{SSL} < \text{STL} \approx \text{STST} < \text{SSST}$ , manteniéndose las relaciones relativas halladas antes del proceso de centrifugación para el parámetro HC-P<sub>TCA</sub> entre SSL, STL, STST y SSST.

### **3.2 Composición de proteínas aisladas de sueros líquidos y deshidratados de soja y tofu**

A partir de la harina fresca que se utiliza como control se obtuvo el aislado de soja nativo (ASN) y el SS a pH 4,5 a partir del cual se obtuvieron PSS<sub>am-4,5</sub> y PSS<sub>ac-4,5</sub> realizando el aislamiento con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y acetona respectivamente. A partir del SS ajustado a pH 8,0 se aislaron PSS<sub>am-8</sub> y PSS<sub>ac-8</sub>. Las PST<sub>ac-5,5</sub> fueron obtenidas desde el ST a su pH original de 5,5.

La Tabla 9 muestra los contenidos de proteína y carbohidratos totales, así como las cantidades de cenizas, calcio y magnesio halladas en estas proteínas aisladas. Los

## *Composición de sueros y proteínas aisladas*

contenidos más altos de proteína fueron hallados en ASN y PSS<sub>am-8</sub>. Para estas proteínas se han informado valores similares. Mitidieri y Wagner (2002) y Palazolo y col. (2004, 2005) hallaron valores Kjeldahl (N×6,25) de  $90 \pm 0,1\%$  para ASN y  $99 \pm 0,5\%$  para PSS<sub>am-8</sub>. La acidificación del SS previo al aislamiento por *salting out* produce una reducción significativa en el contenido de proteína. La PSS<sub>am-4,5</sub> dio un valor significativamente menor que el hallado en PSS<sub>am-8</sub>, resultado que va de la mano con un contenido significativamente mayor de carbohidratos en PSS<sub>am-4,5</sub> ( $p < 0,05$ ; Tabla 9). Estos resultados en conjunto estarían indicando que a pH ácido se favorecería la precipitación conjunta de proteínas y carbohidratos.

**Tabla 9:** Composición de proteínas aisladas. ASN: Aislado de soja nativo. PST y PSS: Proteínas aisladas de sueros de tofu y soja líquidos respectivamente. Los subíndices indican la metodología de aislamiento y el pH del suero de partida. ac: Precipitación con acetona a 0°C. am: Precipitación con sulfato de amonio al 90%.

Muestra	Proteína (% p/p)	Carbohidratos (% p/p)	Conductividad ( $\mu$ S)	Ceniza (% p/p)	Ca (mg/g)	Mg (mg/g)
ASN	$90,53 \pm 0,28^a$	$2,85 \pm 0,11^a$	$40,2 \pm 1,2^a$	$3,75 \pm 0,10^a$	$1,90 \pm 0,06^a$	$0,90 \pm 0,03^a$
PSS <sub>am-8</sub>	$98,25 \pm 0,34^b$	$0,68 \pm 0,14^b$	$8,1 \pm 0,5^b$	$0,40 \pm 0,05^b$	$0,64 \pm 0,03^b$	$0,20 \pm 0,01^b$
PSS <sub>am-4,5</sub>	$89,40 \pm 1,16^a$	$2,02 \pm 0,18^c$	$18,4 \pm 1,3^c$	$0,91 \pm 0,05^c$	$1,09 \pm 0,02^c$	$0,73 \pm 0,03^c$
PSS <sub>ac-8</sub>	$56,72 \pm 1,73^c$	$25,64 \pm 0,83^d$	$42,3 \pm 1,9^a$	$4,92 \pm 0,27^d$	$6,38 \pm 0,09^d$	$2,04 \pm 0,02^d$
PSS <sub>ac-4,5</sub>	$54,25 \pm 2,11^c$	$27,23 \pm 0,72^e$	$96,2 \pm 3,5^d$	$11,20 \pm 0,79^e$	$10,90 \pm 0,11^e$	$7,30 \pm 0,03^e$
PST <sub>ac-5,5</sub>	$40,54 \pm 1,12^d$	$29,73 \pm 1,84^e$	$95,6 \pm 3,7^d$	$16,30 \pm 1,00^f$	$69,60 \pm 0,14^f$	$3,60 \pm 0,02^f$

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Las proteínas aisladas con solvente (de SS o ST) tienen contenidos de proteína significativamente menores que cuando se aíslan por *salting out*, mientras que los contenidos de carbohidratos resultan significativamente mayores ( $p < 0,05$ ; Tabla 9). Estos resultados se atribuyen tanto a la metodología de aislamiento usada como a la falta de una etapa de diálisis que elimine los carbohidratos.

A partir de estos datos es posible calcular como se detalló en 2.7.4, la relación hidratos de carbono totales a proteína (HC: P) expresados como mg carbohidratos/100 mg proteína. A diferencia de HC-P<sub>TCA</sub> que considera la proteína precipitada con TCA y los glúcidos que permanecen unidos luego de 5 lavados, HC: P da cuenta de la relación entre la proteína y los glúcidos presentes en la precipitación original (con acetona o sulfato de amonio) sin la realización de lavados. Cabe mencionar que HC: P será de utilidad ya que las proteínas



## ***Composición de sueros y proteínas aisladas***

serán empleadas en forma directa sin eliminar azúcares mediante lavados exhaustivos siendo las diferencias entre estas relaciones apreciables.

Mientras que la relación HC: P hallada para  $PST_{ac-5,5}$  es de 73,33 mg carbohidratos/100 mg proteína, el parámetro HC- $P_{TCA}$  para STL o STST se ubica en el rango 9,0-9,2 mg carbohidratos/100 mg proteína (Tabla 8).

Las relaciones HC: P son: 3,15 para ASN; 0,69 para  $PSS_{am-8}$ ; 2,26 para  $PSS_{am-4,5}$ ; 45,20 para  $PSS_{ac-8}$ ; 50,19 para  $PSS_{ac-4,5}$  y 73,33 mg carbohidratos/100 mg proteína para  $PST_{ac-5,5}$ .

Entre las proteínas de suero, la menor relación HC: P fue hallada para  $PSS_{am-8}$ ; dicha proteína es la de mayor pureza y será usada como referencia al comparar entre proteínas de suero. Le siguen en orden creciente  $PSS_{am-4,5}$  proteína que también fue dializada como la anterior pero aislada desde un SS ácido, en tanto que el ASN que no fue dializado será usado como control por ser una globulina muy estudiada de la que pueden hallarse valores publicados de muchos de los parámetros analizados. Finalmente las proteínas con las mayores relaciones HC: P son las aisladas con acetona en la que los carbohidratos precipitan junto con las proteínas y no se utiliza diálisis que los elimine.

Los valores de cenizas y calcio de  $PSS_{am-8}$  y  $PSS_{am-4,5}$  fueron significativamente menores que los de ASN control ( $p < 0,05$ ; Tabla 9). Estas diferencias pueden atribuirse a que la última no fue dializada.

Es interesante mencionar que, pese a que el SS de pH 8,0 tiene un contenido mayor de minerales debido al ajuste adicional de pH, al aislar las proteínas por ambas metodologías a partir del SS ácido se obtienen proteínas con una cantidad de minerales significativamente mayor que las aisladas con la misma metodología a partir del suero alcalino ( $p < 0,05$ ; Tabla 9). Nótese que esto también sucede en las proteínas aisladas por *salting out* aún cuando en ambas hubo diálisis ( $p < 0,05$ ; Tabla 9). Como se recordará (sección 2.5.1) la diálisis realizada fue extensa realizando al menos 6 cambios de agua durante 2 días, por lo que puede postularse que los minerales cargados se unen a las proteínas y pueden precipitar junto a los carbohidratos (presumiblemente polisacáridos solubles) ya que siguen el mismo comportamiento frente al pH.

La cantidad de minerales obtenidos de las proteínas aisladas con acetona a sus respectivos pH es  $\approx 12$  veces mayor que la hallada con sulfato de amonio ( $p < 0,05$ ; Tabla 9). Estas diferencias pueden atribuirse a que los agregados formados retienen mayor cantidad de minerales que no son eliminados por diálisis.

Adicionalmente se incluyó la conductividad como una estimación de los minerales libres. Esta última determinación fue realizada disolviendo las proteínas en agua bidestilada (de

## *Composición de sueros y proteínas aisladas*

muy baja conductividad) y midiendo la capacidad de dicha solución para conducir la corriente. Una mayor conductividad es directamente proporcional a la cantidad de minerales libres. Se observa un comportamiento lineal ( $r > 0,99$ ) al correlacionar la conductividad con el contenido de cenizas en todas las muestras excepto  $PST_{ac-5,5}$ . Este aumento en la conductividad muestra que los minerales, inclusive los cationes divalentes en estas muestras se encontrarían mayoritariamente en estado libre, indicando que el proceso de diálisis no fue suficiente como para eliminar la totalidad de los minerales libres. No ocurriría lo mismo con  $PST_{ac-5,5}$ , que teniendo contenidos de cenizas y calcio mayores en  $\approx 50\%$  y  $500\%$  que la muestra  $PSS_{ac-4,5}$ , tiene una conductividad comparable (Tabla 9). Esto permite suponer que  $PST_{ac-5,5}$  contiene una mayor proporción de sus minerales principalmente el calcio ligado a proteínas.

### **3.2.1 Carbohidratos coprecipitados en proteína de sueros líquidos**

El parámetro  $HC-P_{TCA}$  se determinó sobre dispersiones proteicas conteniendo 10 mg proteína/ml, preparadas considerando los contenidos de proteína en las proteínas liofilizadas (Tabla 9). A partir de estas dispersiones proteicas antes y después de centrifugar se precipitó la proteína con TCA eliminado el nitrógeno no proteico y los carbohidratos y resuspendiendo en el volumen inicial. En la Tabla 10 se muestran los resultados de estas determinaciones.

**Tabla 10:** Contenidos de proteínas y carbohidratos en muestras de sueros antes y después de la eliminación de proteínas insolubles por centrifugación.  $HC-P_{TCA}$ : mg carbohidratos coprecipitados /100 mg proteína- $TCA$ . Las concentraciones de proteína y carbohidratos son las halladas al resuspender en el volumen original la proteína precipitada con TCA de dispersiones conteniendo 10 mg proteína/ml.

Muestra	Total		HC- $P_{TCA}$ Total	Solubles (9300 x g, 20 min., 20°C)		HC- $P_{TCA}$ Soluble
	Carbohidratos (mg/ml)	Proteína- $TCA$ (mg/ml)		Carbohidratos (mg/ml)	Proteína- $TCA$ (mg/ml)	
$PSS_{am-8}$	$0,090 \pm 0,004$	$9,45 \pm 0,26$	$0,95 \pm 0,08^a$	$0,092 \pm 0,005$	$9,17 \pm 0,03$	$1,01 \pm 0,50^a$
$PSS_{am-4,5}$	$0,206 \pm 0,010$	$9,15 \pm 0,31$	$2,25 \pm 0,29^b$	$0,184 \pm 0,009$	$7,78 \pm 0,05$	$2,36 \pm 0,16^b$
$PSS_{ac-8}$	$0,282 \pm 0,014$	$9,38 \pm 0,27$	$3,01 \pm 0,14^c$	$0,255 \pm 0,012$	$8,07 \pm 0,09$	$3,16 \pm 0,16^c$
$PSS_{ac-4,5}$	$0,287 \pm 0,013$	$9,30 \pm 0,62$	$3,09 \pm 0,45^c$	$0,260 \pm 0,013$	$7,91 \pm 0,42$	$3,29 \pm 0,66^c$
$PST_{ac-5,5}$	$0,723 \pm 0,036$	$9,22 \pm 0,30$	$7,84 \pm 1,48^d$	$0,646 \pm 0,032$	$7,38 \pm 0,30$	$8,75 \pm 0,09^d$

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

## ***Composición de sueros y proteínas aisladas***

*Sin centrifugación:* El parámetro HC-P<sub>TCA</sub> de las proteínas aisladas desde SS a pH 4,5 o 8,0 ya sea con acetona o con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aumenta siguiendo el mismo orden hallado con las relaciones HC: P en la sección anterior. Ambos parámetros indican que las proteínas aisladas por *salting out* precipitan con una menor cantidad de carbohidratos que cuando son aisladas con acetona. La mayor cantidad de carbohidratos que acompañan a la proteína aislada con solvente puede atribuirse al mecanismo de precipitación que induce la formación de una mayor cantidad de agregados que pueden arrastrar una mayor cantidad de carbohidratos.

Pese a que HC-P<sub>TCA</sub> y HC: P están expresados en las mismas unidades hay una menor variación del parámetro HC-P<sub>TCA</sub> respecto de las relaciones HC: P analizadas en la sección anterior. Mientras que HC-P<sub>TCA</sub> varía entre 0,95 y 7,84 (Tabla 10), HC: P lo hace entre 0,69 y 73,33. La menor variación del parámetro HC-P<sub>TCA</sub> se debe a que solo cuantifica los HC remanentes tras un exhaustivo proceso de lavado mientras que la relación HC: P tiene en cuenta a todos los HC que acompañan a la proteína en la precipitación original.

Nótese que para las proteínas aisladas por *salting out* las diferencias entre el parámetro HC-P<sub>TCA</sub> y la relación HC: P son menores respecto a las proteínas aisladas con acetona. Para PSS<sub>am-4,5</sub> la relación HC: P hallada en la sección anterior es de 2,26 mg carbohidratos/100 mg proteína mientras que la cantidad de carbohidratos coprecipitados es de 2,25 ± 0,29 mg carbohidratos/100 mg proteína (Tabla 10). Por otra parte los valores de HC: P y HC-P<sub>TCA</sub> para PSS<sub>ac-4,5</sub> son 50,19 mg y 3,09 mg carbohidratos/100 mg proteína respectivamente. Los resultados muestran que, pese a que los lavados remueven la mayor parte de los carbohidratos que acompañan a las proteínas en la precipitación original, las proteínas precipitadas con acetona aún contienen cantidades de carbohidratos significativamente mayores respecto a las proteínas precipitadas por *salting out* (p<0,05; Tabla 10).

Finalmente la relación HC: P de PST<sub>ac-5,5</sub> es ≈ 1,5 veces mayor respecto de PSS<sub>ac-4,5</sub> con quien comparte la metodología de aislamiento y el pH ácido mientras que la cantidad de carbohidratos no eliminables mediante lavados estimado con HC-P<sub>TCA</sub> para PST<sub>ac-5,5</sub> es ≈ 2,5 veces mayor respecto de PSS<sub>ac-4,5</sub>, indicando que el tratamiento térmico es un factor importante que aumenta la cantidad de carbohidratos unidos fuertemente a las proteínas.

*Con centrifugación:* La centrifugación aumenta el parámetro HC-P<sub>TCA</sub> en cantidades variables (5-11%) tanto para proteínas aisladas de SS como de ST, indicando que la

## ***Composición de sueros y proteínas aisladas***

centrifugación remueve menos a las proteínas con menor HC-P<sub>TCA</sub> las cuales tendrían una menor solubilidad.

*3.2.1.1 Aislado nativo de soja:* En la sección anterior hallamos que el ASN cumple con la definición de aislado proteico con un contenido de proteína (N×6,25) superior al 90% y la menor relación HC: P entre las proteínas no dializadas. El parámetro HC-P<sub>TCA</sub> del ASN en las dispersiones antes y después de centrifugar fue de  $3,14 \pm 0,18$  y  $3,33 \pm 0,50$  mg carbohidratos/100 mg proteína respectivamente, indicando la baja cantidad de carbohidratos que acompaña al ASN. La cantidad de proteína medida antes y después del proceso de centrifugación fue:  $9,37 \pm 0,20$  y  $8,99 \pm 1,17$  mg de proteína respectivamente pudiéndose estimar una solubilidad próxima al 96%.

### **3.2.2 Carbohidratos en proteínas de sueros liofilizados. Efecto del tratamiento térmico**

En la sección anterior se analizó el parámetro HC-P<sub>TCA</sub> para proteínas aisladas desde sueros líquidos hallándose que, para las proteínas aisladas desde el suero industrial el tratamiento térmico aumenta en gran medida la cantidad de azúcares no removibles mediante lavados.

A fin de determinar el efecto del tratamiento térmico sobre las proteínas presentes en un SSL calentado (SSLC) hasta diferentes temperaturas finales, se procedió como en 2.6.2 para obtener PSSLC (90-180°C) precipitadas con acetona y a partir de ellas se procedió como en 2.7.5 para determinar HC-P<sub>TCA</sub> de estas proteínas aisladas. Los resultados de estas determinaciones se hallan en la Tabla 11. Cantidades mayores de SSLC (150) fueron obtenidas empleando la cápsula reutilizable mostrada en 2.3, obteniendo varios gramos de SSLC (150). Como es de esperarse el contenido de proteína (N×6,25) hallado en esta muestra resulta comparable al de PSS<sub>ac-4,5</sub>.

El HC-P<sub>TCA</sub> para la proteína precipitada con acetona desde SSL (no calentado, Tabla 11) fue  $\approx 2$  veces mayor que el hallado en el SSL (Tabla 8), indicando que la precipitación con solvente aumenta la cantidad de carbohidratos no eliminables mediante lavados. Nuevamente esta mayor cantidad de azúcares no eliminables mediante lavados puede atribuirse a la formación de agregados proteicos que arrastran y retienen una mayor cantidad de carbohidratos.



## *Composición de sueros y proteínas aisladas*

El efecto del calentamiento del suero liofilizado sobre sus proteínas será analizado sobre las proteínas precipitadas con acetona, tomando como referencia a las proteínas aisladas desde el SSL (PSSL) debido a que no ha sido calentado.

Tal y como se ha venido realizando se utilizará el parámetro HC-P<sub>TCA</sub> para cuantificar la cantidad de carbohidratos que acompañan a las proteínas. Sin embargo, debido a las condiciones de baja humedad y a las altas temperaturas alcanzadas, se considera que una parte de los carbohidratos pueden encontrarse unidos a las proteínas debido a la formación de glicoproteínas durante el tratamiento térmico.

**Tabla 11:** HC-P<sub>TCA</sub>: mg carbohidratos/100 mg proteína<sub>-TCA</sub> de proteínas aisladas con acetona. PSSL: Proteína precipitada con acetona desde SSL sin calentar y calentado hasta distintas temperaturas. Se indican las temperaturas a las que fueron calentados los SSL entre paréntesis.

Muestra	HC-P <sub>TCA</sub> Total	HC-P <sub>TCA</sub> Soluble (9300 x g, 20 min., 20°C)
PSSL	6,01 ± 0,64 <sup>a</sup>	7,67 ± 0,27 <sup>a</sup>
PSSLC (90)	12,44 ± 0,97 <sup>b</sup>	15,09 ± 0,48 <sup>b</sup>
PSSLC (120)	13,00 ± 1,88 <sup>b</sup>	14,25 ± 1,36 <sup>b</sup>
PSSLC (130)	13,95 ± 1,80 <sup>b</sup>	19,19 ± 1,93 <sup>c</sup>
PSSLC (140)	15,76 ± 2,86 <sup>b,c</sup>	19,54 ± 2,52 <sup>c</sup>
PSSLC (150)	18,75 ± 3,40 <sup>c</sup>	34,40 ± 3,20 <sup>d</sup>
PSSLC (180)	27,40 ± 0,74 <sup>d</sup>	62,11 ± 4,88 <sup>e</sup>

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes (p<0,05).

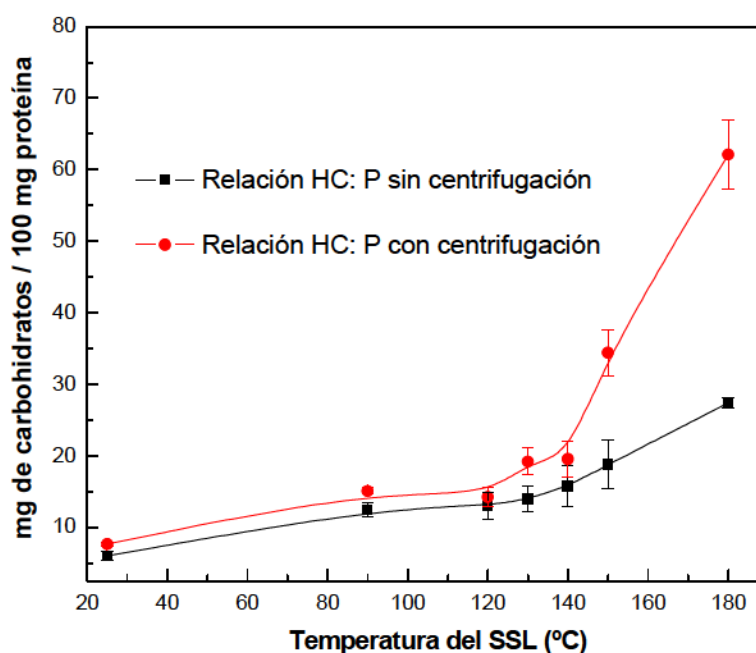
Esta afirmación se basa en observaciones realizadas durante el trabajo de Magíster (Sobral, 2007) en el cual se observó un aumento en la intensidad del color y en la aglomeración cuando el SSL fue calentado hasta 90-120°C, mientras que el SSLC entre 130-140°C formó un caramelo de un color pardo-rojizo que alcanzó su máxima coloración, compactación y pegajosidad entre 150-180°C. La presencia de glicoproteínas fue confirmada aislando las proteínas con acetona a partir de SSLC y analizando las mismas por SDS-PAGE empleando la coloración de PAS.

Es bien sabido que la presencia de azúcares puede modificar las propiedades funcionales de una proteína sobre todo cuando los mismos están unidos a las proteínas mediante glicosilación. Una alternativa preferida para glicosilar una proteína debido a que no hace empleo de reactivos tóxicos y es una metodología natural es utilizar la reacción de Maillard

## Composición de sueros y proteínas aisladas

en donde, se induce la reacción entre un residuo  $\epsilon$ -amino de la lisina de una proteína con una grupo carbonilo de un azúcar reductor (Chevalier y col., 2001).

Se espera que estas proteínas glicosiladas tales como la PSSLC (150) en donde los factores antitripticos han sido adecuadamente inactivados (como se verá en la sección 3.3) y con la que se realizarán varios ensayos, tengan mejores propiedades funcionales respecto de las no calentadas. Es bien conocido que la reacción de Maillard realizada en ausencia de agua en condiciones controladas (temperatura, tiempo, humedad relativa) resulta un método adecuado que mejora las propiedades funcionales de las proteínas sin cambios estructurales importantes (Morgan y col., 1997; Oliver y col., 2006 y Oliver, 2011).



**Figura 9:** HC- $P_{TCA}$ : mg carbohidratos/100 mg proteína- $TCA$  de proteínas aisladas con acetona. Las determinaciones fueron realizadas antes y después de centrifugar (9300 x g, 20 min., 20°C).

Para una mejor interpretación los datos de la Tabla 11 se grafican en la Figura 9. En ella se observa que, en la medida que el tratamiento térmico se intensifica hay un aumento de la relación HC- $P_{TCA}$  que se corresponde con aumento en la proporción de azúcares respecto a proteína. Nótese que esta tendencia se acentúa al realizar la precipitación a partir de dispersiones proteicas centrifugadas debido a la eliminación de proteínas menos glicosiladas de menos solubilidad.

### **3.3 Actividad antitriptica en sueros de soja y tofu, líquidos y deshidratados**

Se determinaron los porcentajes de actividad de la tripsina (AT%) e inhibición de la tripsina equivalente a la actividad antitriptica (AA%) empleando las ecuaciones 4 y 5. Para los sueros líquidos se agregó HCl 0,1N hasta alcanzar 1,0 mg de proteína/ml, para los sueros deshidratados se prepararon extractos empleando una relación suero deshidratado: HCl 0,05N que permita alcanzar una relación de proteína que sea equivalente a fin de poder comparar los resultados. Los datos de dichas determinaciones se muestran en la Tabla 12.

La AA% hallada en los sueros líquidos fue significativamente mayor respecto de los correspondientes sueros liofilizados ( $p < 0,05$ ; Tabla 12). De forma equivalente a lo explicado en 3.1.1, la liofilización esta precedida de una etapa de crio-concentración y hay además etapas de manipulación de los sueros que pueden explicar esta merma en la AA% hallada. Cuando analizamos los sueros liofilizados puede verse que la AA% del STL resulta 3,3 veces menor a la obtenida con el SSL, este valor resultó similar al hallado previamente, que fue de 3,1 veces (Sobral y Wagner 2007b).

**Tabla 12:** Actividad antitriptica (AA) en sueros líquidos y deshidratados. Abreviaturas en Tabla 7.

Muestras	AA (%)
SS	$63,3 \pm 1,4^a$
ST	$21,6 \pm 1,6^b$
SSL	$59,8 \pm 1,3^c$
SSST	$1,6 \pm 0,1^d$
STL	$18,1 \pm 1,7^e$
STST	$<0,1^f$

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Como es esperable un secado térmico produce una reducción adicional en la AA% debido a desnaturalización fundamentalmente del ITK (más termolábil). Por ello la AA% del SSST es significativamente menor respecto a la hallada en SS y SSL en tanto que la AA% de STST es significativamente menor que la hallada en ST y STL, habiéndose realizado el secado de ambos sueros en las mismas condiciones.

## *Composición de sueros y proteínas aisladas*

Está bien documentado por estudios DSC en dispersiones acuosas al 20% p/p de PSS<sub>am-8</sub> que el ITK se desnaturaliza a  $74,4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  (Sorgentini y Wagner, 1999) mientras que en nuestros ensayos la temperatura de secado nunca superó los  $50^{\circ}\text{C}$ . La desnaturalización hallada se atribuye al proceso de secado que comienza con 5 h a  $50^{\circ}\text{C}$  (sección 2.2) e involucra numerosas etapas de manipulación (congelación, molienda secado secundario). Sorgentini y Wagner (1999) trabajando en forma comparativa con PSS<sub>am-8</sub> y ASN hallaron niveles de desnaturalización superiores al 40% para las PSS<sub>am-8</sub> (referencia ASN). Este comportamiento fue atribuido a una mayor tendencia a la desnaturalización de PSS<sub>am-8</sub> durante las manipulaciones practicadas durante el proceso preparativo.

Ya se ha visto en la Tabla 8 que el parámetro HC-P<sub>TCA</sub> de las proteínas en el SSST es  $\approx 3$  veces mayor al hallado en el SSL. Se postula que la glicosilación podría reducir la actividad antitriptica ya sea por la unión de azúcares directamente en el sitio activo donde el ITK se une a la tripsina, cambiando el entorno químico del mismo o por impedimentos estéricos que dificulten la unión del factor inhibidor con su sustrato.

### **3.3.1 En suero de soja liofilizado: Efecto del tratamiento térmico**

En esta sección se analiza el efecto del tratamiento térmico hasta distintas temperaturas finales sobre la actividad antitriptica en SSL y SSLC. Dado que se trata de la misma muestra con diferentes tratamientos térmicos los extractos fueron preparados empleando la misma relación SSL o SSLC: HCl 0,05N. Los resultados de estas determinaciones se muestran en la Tabla 13.

**Tabla 13:** Actividad antitriptica (AA) en suero de soja liofilizado (SSL), sin y con calentamiento. Se indican las temperaturas a las que fueron calentados los SSL entre paréntesis.

T(°C)	AA (%)
SSL	$59,8 \pm 4,0^a$
SSLC (90)	$58,1 \pm 3,6^a$
SSLC (120)	$56,6 \pm 2,5^a$
SSLC (130)	$55,5 \pm 4,7^a$
SSLC (140)	$35,3 \pm 2,5^b$
SSLC (150)	$2,9 \pm 0,1^c$
SSLC (180)	$2,1 \pm 0,1^c$

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



## *Composición de sueros y proteínas aisladas*

La AA% hallada para el actual SSL con la determinada en el SSL obtenido durante mi trabajo de Magíster no fueron equivalentes. La AA% hallada para dicho SSL fue  $51,6 \pm 3,1\%$  la cual es significativamente menor respecto al valor mostrado en la Tabla 13 lo cual indica una mayor actividad antitriptica para el SSL analizado en este trabajo. La mayor actividad hallada para el nuevo SSL puede atribuirse tanto a cambios en la materia prima como al hecho que la harina utilizada en el presente trabajo no fue almacenada. Por el contrario el SS preparado con anterioridad fue obtenido a partir de una harina con un tiempo de almacenamiento a  $4^{\circ}\text{C}$  superior a 1 año. Durante el almacenamiento de la harina hay interacción entre los componentes y es probable que se produzca la desnaturalización del ITK con pérdida en la actividad antitriptica dando las diferencias observadas. Estudios de almacenamiento del SSL durante el Magíster mostraron que ITK se desnaturaliza a mayor velocidad que el otro componente proteico mayoritario del suero, la lectina.

En la Tabla 13 se puede observar que la AA% del SSL no presenta diferencias significativas con la del SSLC tratado entre  $90$  y  $130^{\circ}\text{C}$ . Las diferencias se vuelven significativas a partir de  $140^{\circ}\text{C}$  temperatura a partir de la cual se observa una marcada reducción en la actividad biológica.

La AA% hallada en el SSLC (150) es menor al 5% de la AA% que presenta el SSL, indicando una inactivación de los factores antitripticos superior al 95% en el SSLC (150). Este grado de inactivación alcanzado justifica la obtención de cantidades mayores de SSLC (150) para aislar PSSLC (150) con un nivel aceptablemente bajo de los factores antitripticos. Tomando como referencia al SSL se calculó la actividad antitriptica relativa (AAR%) empleando la ecuación 6, las cuales se grafican en la Figura 10.

En la Figura 10 se aprecia que la AAR% se ajusta a un modelo sigmoideo descendente en donde la mayor reducción en la actividad antitriptica se produce entre  $130$  y  $150^{\circ}\text{C}$ . Adicionalmente aún después del tratamiento térmico más enérgico realizado ( $180^{\circ}\text{C}$ ) la AAR alcanza un valor de  $3,5 \pm 0,1\%$ .

Como se detalló 1.3.2 la actividad antitriptica se debe a la acción de dos factores antitripticos presentes el ITK de  $20,1$  kDa responsable del 95% de la actividad antitriptica más sensible al tratamiento térmico y el ITBB de menor tamaño ( $8$  kDa) y mayor resistencia térmica capaz incluso de resistir procesos de cocción y el pH estomacal debido a la elevada cantidad de puentes disulfuro.

## Composición de sueros y proteínas aisladas

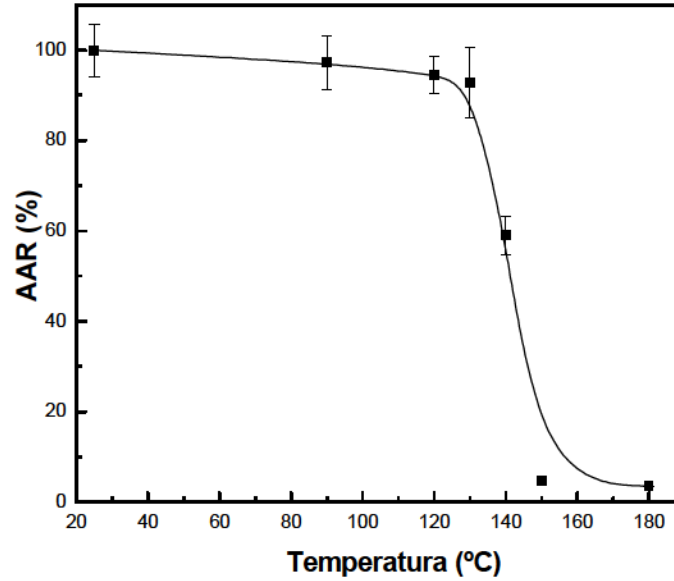


Figura 10: Reducción de la actividad antitriptica relativa (AAR) del SSL con la temperatura de tratamiento.

### 3.3.2 En proteínas aisladas

La AAR% fue analizada como en 3.3, empleando los datos de la Tabla 9 a fin de equiparar las relaciones proteína: HCl 0,05 N, tomando como referencia a PSS<sub>am-8</sub> a fin de calcular las AAR% para las proteínas las cuales se muestran en la Figura 11.

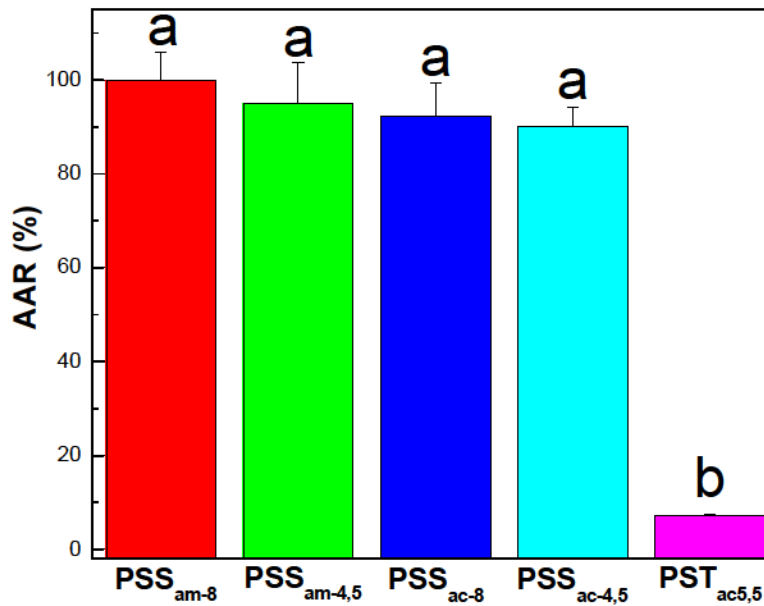


Figura 11: Actividad antitriptica relativa (AAR) en proteínas aisladas. Las abreviaturas de las muestras fueron dadas en la Tabla 9. Letras diferentes sobre las barras indican valores significativamente diferentes entre muestras ( $p < 0,05$ ).

## ***Composición de sueros y proteínas aisladas***

Las AAR% mostradas en la Figura 11 indican que no hay diferencias significativas entre las proteínas aisladas con acetona o con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $p < 0,05$ ; Figura 11). Pese a ello se advierte que las proteínas aisladas mediante *salting out* tienen una actividad antitriptica ligeramente mayor que cuando son aisladas con solvente y que empleando una misma metodología de aislamiento a partir de SS (pH 8,0) se conserva una mayor actividad antitriptica.

Como es de esperar y debido a los tratamientos térmicos aplicados durante la obtención del ST, la actividad antitriptica de las proteínas aisladas a partir de este suero ( $\text{PST}_{\text{ac-5,5}}$ ) es significativamente menor respecto de las demás proteínas ( $p < 0,05$ ; Figura 11).

Estos resultados indican que, la tanto la precipitación con acetona como el pH ácido de suero disminuyen la actividad antitriptica en las proteínas aisladas y que la combinación de ambos conduce a la obtención de  $\text{PSS}_{\text{ac-4,5}}$  las cuales tienen el menor nivel de actividad antitriptica entre las proteínas aisladas desde un SS.

### **3.4 Electroforesis de proteínas aisladas no tratadas térmicamente**

En esta sección se analizarán los perfiles electroforéticos de las proteínas utilizadas en este trabajo, primero en condiciones desnaturalizantes por SDS-PAGE con y sin el agregado de un agente reductor para: i) estimar el PM de las principales fracciones halladas; ii) identificar, de acuerdo a su PM, la posible identidad de las fracciones presentes en cada proteína aislada así como la presencia de agregados; iii) estudiar cambios en los perfiles electroforéticos debidos a diferencias en las materias primas, variantes preparativas y metodologías de aislamiento ensayadas. En una etapa posterior se analizará el efecto del tratamiento térmico.

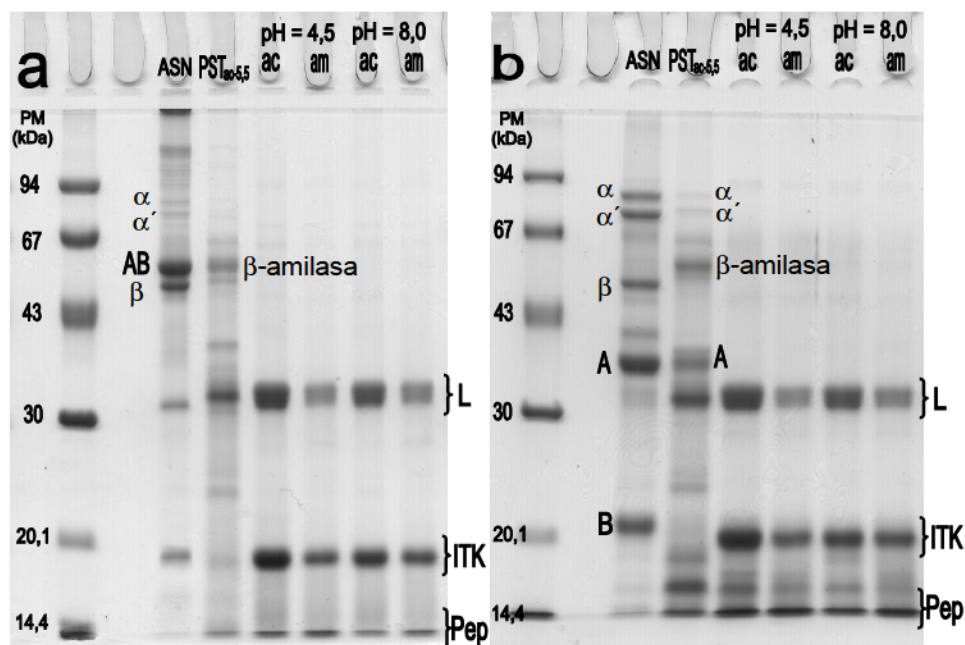
*De aislados de soja:* Según datos bibliográficos los aislados de soja están constituidos por dos tipos de globulinas de almacenamiento: la 7S o  $\beta$ -conglucina y la 11S o glicina, que representan el 30 y 40% respectivamente de la proteína total en la semilla (Utsumi, 1992; Utsumi y col., 1997). La 7S es un trímero formado por las subunidades  $\alpha'$  (PM  $\approx$  72 kDa),  $\alpha$  (PM  $\approx$  68 kDa) y  $\beta$  (PM  $\approx$  52 kDa); mientras que la 11S consiste de 6 subunidades cada una de las cuales esta formada por una cadena polipeptídica A (ácida, PM  $\approx$  35 kDa) unida

## Composición de sueros y proteínas aisladas

por puentes disulfuro a las subunidades B (básicas y PM  $\approx$  20 kDa), (Mori y col., 1981; Nielson 1985a, 1985b, Staswick y col., 1984).

Mujoo y col. (2003) realizaron SDS-PAGE de aislados de soja obtenidos a partir de 7 variedades de porotos hallando un patrón electroforético cuyas bandas principales son:  $\alpha'$  (80 kDa),  $\alpha$  (75 kDa),  $\beta$  (50 kDa), polipéptido A (34 kDa) y polipéptido B (15 kDa).

En la Figura 12a, en el gel en condiciones no reductoras, la muestra ASN se resuelve en las subunidades  $\alpha'$  y  $\alpha$  (PM:  $78,9 \pm 1,3$  y  $72,3 \pm 1,5$  kDa), la banda correspondiente al dímero AB (PM:  $61,3 \pm 0,6$ ), la subunidad  $\beta$  (PM:  $57,4 \pm 0,7$  kDa), y dos bandas con PM de  $36,2 \pm 0,3$  kDa y  $19,2 \pm 0,3$  kDa que, como se verá seguidamente, pueden atribuirse a la contaminación del aislado con dos proteínas características del suero de soja, la lectina y el factor antitripsínico de Kunitz. Este resultado coincide con lo informado por Sathe y col. (1989) que detectaron en aislados de soja una banda a 20 kDa que atribuyeron al ITK.



**Figura 12:** a) SDS-PAGE. b) ME-SDS-PAGE, sembrando 15  $\mu$ g proteína/calle. A la izquierda de cada gel se encuentran las bandas correspondientes a los patrones de PM junto a sus respectivos PM. Subunidades de la  $\beta$ -conglucina:  $\alpha$ ,  $\alpha'$  y  $\beta$ . Polipéptidos de la glicinina: A y B. AB: A-s-s-B. Proteínas de suero:  $\beta$ -amilasa, L, ITK e ITBB. L: Subunidades de lectina. ITK e ITBB Inhibidores de la tripsina de Kunitz y de Bowman-Birk respectivamente. Pep: Péptidos de PM < 14,4 kDa.

En la misma Figura 12a, se observa que ASN tiene agregados de PM tan elevado que permanecen en el punto de siembra (PM > 120 kDa) y otros agregados más livianos con PM



## *Composición de sueros y proteínas aisladas*

comprendidos entre 97 y 115 kDa que lograron atravesar el gel apilador pero no se desplazaron por el gel separador.

Petruccelli y Añón (1995a) analizaron aislados por SDS-PAGE en condiciones no reductoras hallando agregados de alto PM (180-190 kDa) que los atribuyeron a dímeros o trímeros de subunidades  $\alpha'$  y  $\alpha$ . También detectaron agregados de PM intermedio (115-120 kDa) que informaron estar formados por subunidades  $\alpha'$  y  $\alpha$  y polipéptidos B.

En presencia del agente reductor (Figura 12b) se observa la desaparición de las bandas correspondientes a los agregados que permanecían en el punto de siembra y aquellos que atraviesan el gel apilador, demostrando que los agregados están estabilizados por puentes disulfuro disociables en condiciones reductoras. En dichas condiciones se disocia el polipéptido AB y se liberan de los agregados las subunidades  $\alpha'$  y  $\alpha$  que ingresan al gel separador, dando un aumento en la intensidad de dichas bandas y la aparición de bandas a 38 y 19 kDa respectivamente correspondientes a los polipéptidos A y B liberados por la disociación del dímero AB (estabilizado por puentes disulfuro).

*De proteínas de suero de soja y tofu:* PST<sub>ac-5.5</sub> presenta un perfil electroforético caracterizado por una zona superior del gel (con PM > 67 kDa) libre de bandas, indicando la ausencia de agregados proteico o de las fracciones  $\alpha'$  y  $\alpha$  halladas en el ASN (Figura 12a). PST<sub>ac-5.5</sub> se resuelve en: i) zona 55-65 kDa, con una banda principal de  $60,9 \pm 1,3$  kDa atribuible a la  $\beta$ -amilasa y posibles trazas del dímero AB; ii) banda a  $35,7 \pm 1,3$  kDa correspondiente a la subunidad de L.

El ST de una industria local española analizado por SDS-PAGE por Espinosa-Martos y col. (2006) mostró bandas a 55, 35 y 10 kDa, resultados coincidentes con los nuestros. En condiciones reductoras (Figura 12b), PST<sub>ac-5.5</sub> presenta además una banda a 45 kDa correspondiente al polipéptido A liberado y un grupo de bandas cuyo PM es menor a 20 kDa, en donde se destaca una banda de mayor intensidad de PM 18 kDa. Estas bandas podrían ser atribuidas a subunidades liberadas en condiciones reductoras. La banda cuyo PM <14,4 kDa estaría formada por péptidos y especies de menor tamaño tales como el ITBB de 8 kDa que estarían formando agregados. Se postula que las especies de bajo peso molecular podrían ser productos de la hidrólisis térmica de fracciones de mayor PM o a la interacción entre proteínas de suero y polipéptidos con el calcio.

Las proteínas aisladas con acetona o con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a partir de SS a pH 4,5 o 8,0 producen patrones electroforéticos idénticos con tres fracciones principales atribuibles a la presencia

## Composición de sueros y proteínas aisladas

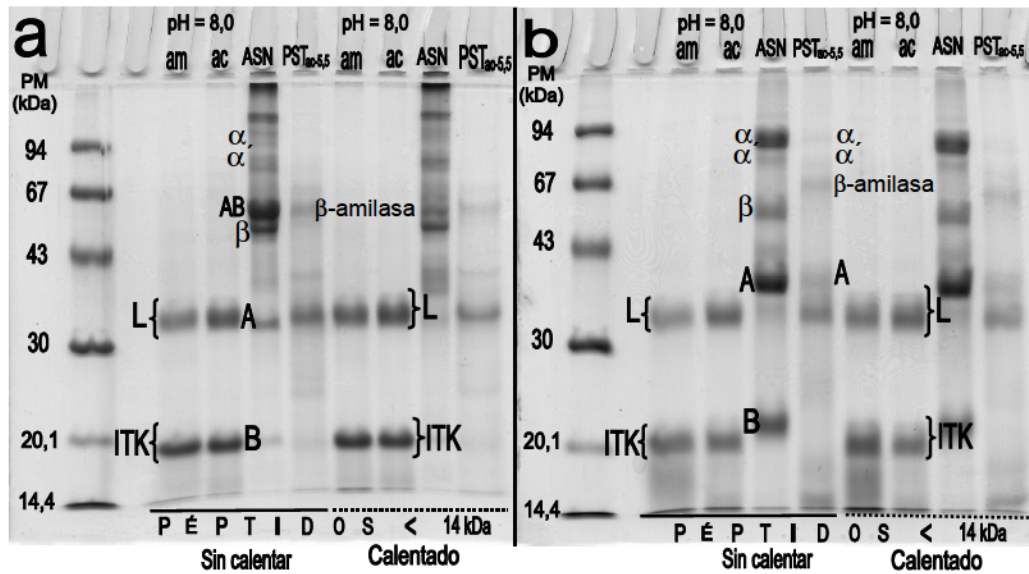
de las subunidades de L (PM:  $35,8 \pm 0,4$  kDa) e ITK (PM:  $18,3 \pm 0,2$  kDa) y bandas en el fondo del gel con  $PM < 13,6$  kDa en (Figura 12a).

En condiciones reductoras (Figura 12b) las PSS mantienen su perfil electroforético con un aumento de la intensidad de las bandas con  $PM < 20,1$  kDa.

### 3.4.1 Electroforesis de proteínas aisladas y tratadas térmicamente

*De aislados de soja tratados térmicamente:* En esta sección se analizarán los cambios en los perfiles electroforéticos de proteínas al ser térmicamente desnaturalizadas. Las proteínas fueron seleccionadas por ser representativas del comportamiento hallado en el resto de las proteínas utilizadas. A partir de las proteínas liofilizadas se prepararon dispersiones acuosas (sección 2.11.2) las cuales fueron tratadas térmicamente de forma de producir la desnaturalización total de las proteínas.

En la Figura 13a se analizan los patrones electroforéticos de ASN,  $PST_{ac-5,5}$ ,  $PSS_{am-8}$  y  $PSS_{ac-8}$  en forma nativa y tras su desnaturalización térmica. En el ASN la desnaturalización reduce notablemente la intensidad del dímero AB.



**Figura 13:** a) SDS-PAGE. b) ME-SDS-PAGE, sembrando 30  $\mu$ g proteína/calle. La nomenclatura es la usada en la Figura 12. Las 4 calles ubicadas a la derecha del gel denominadas “Calentado” contienen proteínas totalmente desnaturalizadas. Se muestra para comparar los resultados de las mismas muestras sin el tratamiento térmico “Sin calentar”.

Petrucelli y Añón (1995b) trataron térmicamente dispersiones acuosas de ASN durante 30 minutos hasta diferentes temperaturas finales (entre 60 y 100°C) demostrando por DSC que

## *Composición de sueros y proteínas aisladas*

por debajo de 80°C hay una desnaturalización total de la  $\beta$ -conglucina y parcial de la glicina sin cambios en los patrones electroforéticos ni formación de agregados. Por el contrario a temperaturas mayores hallaron diferencias centradas en la cantidad del dímero AB detectada; a 100°C (como en nuestros ensayos) las diferencias se hacen evidentes entre los 3 y 6 minutos de tratamiento. Estos autores, tomando como referencia a la subunidad  $\beta$  de la 7S por ser la menos afectada durante el tratamiento térmico, hallaron una notable reducción en la intensidad del dímero AB, sin cambios apreciables en la cantidad de agregados (100-200 kDa) en tratamientos térmicos que abarcaron hasta 15 minutos.

En nuestros ensayos se encuentra un incremento en la intensidad correspondientes a las bandas  $\alpha'$  y  $\beta$  de la 7S que se observan más definidas tras el tratamiento térmico y una reducción en la intensidad de la banda correspondiente al polipéptido A.

A partir de los densitogramas se determinó la intensidad de los picos y se calculó la relación  $Ac/A$ . Donde  $Ac$ : Área de una banda dada luego del tratamiento térmico y  $A$ : Área de la correspondiente a dicha banda antes del tratamiento térmico. Dichas relaciones para las bandas  $\alpha'$  y  $\beta$  son 1,7 y 2,6 respectivamente, confirmando el incremento observado en la intensidad. Mientras que para el dímero AB y el polipéptido A dichas relaciones son 0,6 y 0,3 respectivamente, cuantificando la reducción en la intensidad.

Cabe mencionar que la intensidad de los agregados no cambia debido al tratamiento térmico, la presencia de agregados luego del tratamiento térmico a temperatura superior a la de desnaturalización sugiere que los mismos son estables al tratamiento aplicado o que se forman nuevamente durante el proceso de enfriamiento (Petruccelli y Añón, 1995b).

A diferencia de las SDS-PAGE, en las ME-SDS-PAGE no observan cambios en el perfil electroforético para el ASN antes y después de ser tratado térmicamente.

*De proteínas de suero de soja y tofu tratados térmicamente:* El tratamiento térmico produce un corrimiento de las bandas hacia PM ligeramente mayores y un incremento en la intensidad relativa de las bandas (Figura 13a). Los corrimientos en las bandas así como los cambios en la intensidad de las mismas se cuantificaron a partir de los densitogramas correspondientes. Los corrimientos en las bandas fueron expresados directamente en kDa, mientras que las intensidades fueron cuantificadas mediante la relación  $Ac/A$ .

La relación  $Ac/A$  para los agregados ubicados en la parte superior del gel son 1,4 y 2,1 para las proteínas aisladas con acetona y *salting out* respectivamente. Dicho incremento en la intensidad se correlaciona con un aumento en la cantidad de agregados. El menor

## ***Composición de sueros y proteínas aisladas***

incremento en la intensidad de las bandas para las proteínas aisladas con solvente se atribuye a que la precipitación con solvente induce la formación de agregados, por lo que un tratamiento térmico adicional produce un menor incremento en la cantidad de agregados.

Por ambas metodologías de aislamiento se hallan las bandas atribuibles a L e ITK ubicadas a  $35,2 \pm 0,3$  y  $18,5 \pm 0,3$  kDa respectivamente, mientras que luego del tratamiento térmico las bandas se ubican a  $36,0 \pm 0,1$  y  $19,1 \pm 0,2$  kDa, respectivamente. El corrimiento de las bandas hacia la zona de mayores PM luego del tratamiento térmico puede atribuirse a un mayor grado de agregación.

En condiciones reductoras (Figura 13b) la relación Ac/A para la banda correspondiente a los agregados fue  $\approx 1,0$  y  $1,5$  para las proteínas aisladas con acetona y *salting out* respectivamente. El incremento en la cantidad de agregados para las proteínas aisladas por *salting out* es mayor debido al menor contenido inicial de agregados presentes en estas proteínas. En estas condiciones y por ambas metodologías de aislamiento, las bandas de L e ITK se ubican a  $35,6 \pm 0,2$  y  $19,8 \pm 0,3$  kDa, respectivamente. El tratamiento térmico no produce cambios en la ubicación de las bandas.

Finalmente PST<sub>ac-5.5</sub> se resuelve en 3 bandas principales ubicadas a  $62,2 \pm 1,3$ ;  $44,3 \pm 1,6$  y  $36,0 \pm 1,4$  kDa respectivamente, no observándose cambios significativos tras el tratamiento térmico. Este resultado está de acuerdo con que son proteínas con un alto grado de desnaturalización debido a los tratamientos térmicos experimentados durante la preparación del tofu.

### **3.5 Conclusiones parciales**

Los sueros de soja y tofu son subproductos del procesamiento de la soja caracterizados por su alto grado de dilución. Una vez secados los componentes mayoritarios son los carbohidratos seguidos de las proteínas con cantidades variables de ceniza y calcio.

El suero de soja tiene una mayor concentración de carbohidratos y proteínas respecto al suero de tofu, por ello el extracto seco del primero es mayor presentando el segundo un mayor contenido de minerales (cenizas) y calcio debido al agregado de  $Cl_2Ca$  durante su proceso de obtención.

El alto grado de dilución de los sueros determina que una estrategia de secado simplifique las operaciones de manipulación, utilización y aislamiento de proteínas. En las proteínas



## *Composición de sueros y proteínas aisladas*

precipitadas con TCA a partir de estos sueros es posible eliminar la mayor parte de los carbohidratos mediante lavados. La cantidad remanente de carbohidratos que quedan junto a las proteínas depende del contenido de carbohidratos en el suero de partida y del proceso de secado.

Las proteínas aisladas con acetona en frío a partir de estos sueros se caracterizan por un menor contenido de proteína (Nx6,25), una mayor cantidad de carbohidratos, minerales totales y libres. En contraste las proteínas aisladas por *salting out* y posterior diálisis se caracterizaron por un alto contenido de proteína (Nx6,25 >90%) y cantidades significativamente menores de carbohidratos y minerales eliminados durante la diálisis.

La actividad antitriptica porcentual del suero de tofu es 3 veces menor que la del suero de soja debido a los numerosos tratamientos térmicos aplicados durante la obtención de este último. Dado que esta actividad antitriptica depende del procesamiento y de la manipulación del suero, la liofilización (por crio concentración) o el secado a baja temperatura (<50°C) reducen esta actividad.

El patrón electroforético de las proteínas del suero de soja constó sólo de tres bandas atribuidas a las subunidades de lectina y los factores antitripticos de Kunitz y de Bowman-Birk. Por el contrario el patrón electroforético hallado en las proteínas del suero de tofu fue más complejo hallándose tanto las proteínas propias del suero de soja como algunas subunidades de proteínas de reserva de soja. La desnaturalización térmica de las proteínas no produjo cambios en el patrón electroforético.

# **4. Comportamiento térmico de sueros y de sus proteínas aisladas**

### **4.1 Comportamiento térmico de suero de soja liofilizado**

El estudio del comportamiento térmico de SSL fue realizado previamente a este trabajo de tesis (Sobral, 2007; Sobral y Wagner, 2007a) pero vuelto a realizar como parte del control de las características del suero de soja de partida. El SSL utilizado en los estudios volcados en este capítulo tiene un contenido de glúcidos superior al 68% (Tabla 7, sección 3.1) lo que se traduce en un suero muy higroscópico y con tendencia a la cristalización de azúcares, motivo por el cual se almacenó en condiciones anhidras (sección 2.4) y a  $T < T_g$  del sistema a fin de evitar la cristalización de azúcares, lo que ocasionaría cambios en el comportamiento térmico. La  $T_g$  de SSL es  $-3,3 \pm 0,1^\circ\text{C}$ , coincidiendo con los resultados previos (Sobral y Wagner, 2007a).

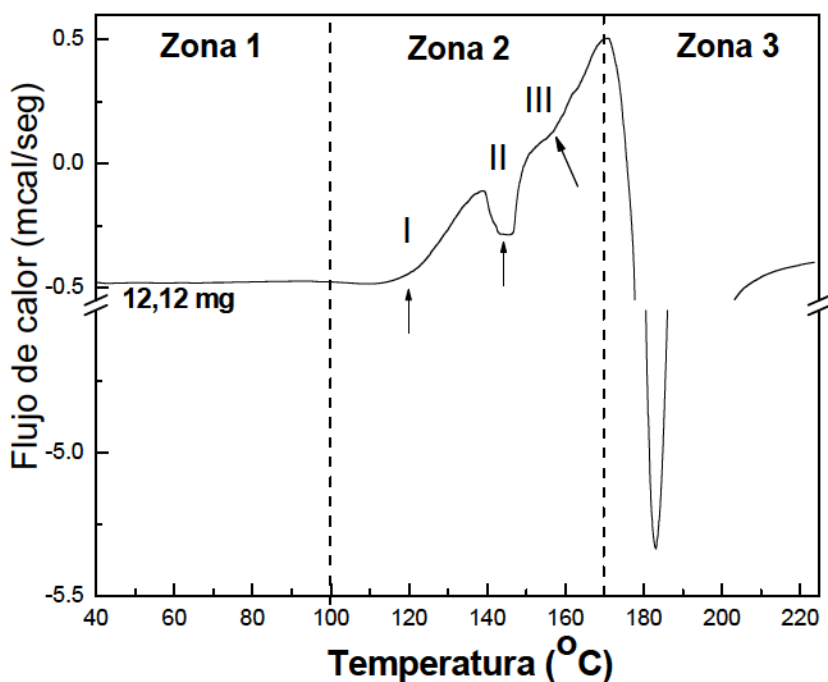
#### **4.1.1 Termograma de SSL en condiciones anhidras**

El comportamiento térmico de SSL en condiciones anhidras fue realizado empleando un calorímetro diferencial de barrido DSC Q-100, *T.A. Instruments*. El termograma obtenido, que se muestra en la Figura 14, se puede dividir en 3 zonas denominadas: zona 1 ( $T < 100^\circ\text{C}$ ), zona 2 ( $100 < T < 170^\circ\text{C}$ ) y zona 3 ( $T > 170^\circ\text{C}$ ), similares a las halladas previamente (Sobral y Wagner, 2007a).

En la zona 1, después de haberse superado la  $T_g$  del sistema, no se observa ninguna transición térmica. Esto indica por un lado que no hay cristales de azúcares, dado que de haberlos debería aparecer una endoterma de fusión en esta zona. Resultados previos obtenidos con SSL cristalizado por un almacenamiento muy prolongado mostraron una transición atribuida a la fusión a  $66,7^\circ\text{C}$  (Sobral y Wagner, 2007a). Por otra parte, la ausencia de endotermas a  $< 100^\circ\text{C}$  indica que las proteínas presentes en SSL, o están desnaturalizadas o de estar nativas, se desnaturalizan a  $T > 100^\circ\text{C}$ . Efectivamente, esto último se pudo comprobar al analizar la zona 2 del termograma. En la zona 2, entre 100 y  $170^\circ\text{C}$ , es posible visualizar tres transiciones endotérmicas denominadas I, II y III, que corresponden a la desnaturalización de L, ITK e ITBB (Sobral y Wagner, 2007a).

## Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas

En las condiciones del ensayo, se vio en la sección 3.3.1 que la actividad antitriptica de SSL anhidro disminuye marcadamente cuando se alcanzan los 140-150°C, lo cual apoya la idea de que el pico II ( $T_{\max} \approx 140-150^{\circ}\text{C}$ ) corresponde a la desnaturalización del ITK.



**Figura 14:** Termogramas de SSL analizado en condiciones anhidras. Se utilizó una cápsula de DSC vacía como referencia y una rampa de calentamiento de 5°C/min. Se indica la masa anhidra colocada dentro de la cápsula.

La baja resolución de las transiciones de desnaturalización es atribuible al bajo contenido de proteínas en la muestra. El contenido de proteína- $T_{CA}$  en el SSL analizado en este trabajo fue de  $10,15 \pm 0,53\%$  p/p (Tabla 7, sección 3.1). Se puede ver además que, las endotermas se desarrollan con una línea de base que deriva hacia arriba, formando parte de una gran transición exotérmica con máximo a 170°C, que se atribuye a la glicosilación de las proteínas en presencia de altas concentraciones de oligosacáridos del suero. Es sabido que las reacciones de glicosilación son de naturaleza exotérmica y consisten en la formación de nuevas uniones covalentes e irreversibles entre los azúcares y las proteínas (Aponte-Ramírez y col., 2009). La formación de proteínas glicosiladas en SSL calentado fue demostrado en 3.2.2 aislando las proteínas con acetona y estimando la relación entre carbohidratos y proteína mediante el parámetro HC-P (mg carbohidratos/100 mg proteína- $T_{CA}$ ).



## ***Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas***

Después de 170°C (zona 3) comienza una nueva endoterma que se atribuyó a la descomposición térmica de la muestra (Sobral, 2007). Siendo la sacarosa el carbohidrato más abundante del SSL sería esperable que esta transición endotérmica tenga relación con la descomposición de este azúcar. Weast (1986) informó una endoterma con un  $T_p$  de  $185 \pm 0,5^\circ\text{C}$  para la sacarosa anhidra. Por otra parte, los estudios de Roos (1995) mostró que las reacciones de pardeo y caramelización de azúcares ocurre por encima de los 150°C. La descomposición de azúcares normalmente se observa por DSC en el rango de temperaturas entre 200-400°C (Pavlath y Gregorski, 1985).

Para confirmar que el pico II corresponde a la desnaturalización del ITK son útiles las medidas de actividad antitriptica en muestras SSLC informadas en el capítulo 3 (sección 3.3.1). La AA% en SSLC (90-130°C) se redujo apenas en un 7,2% respecto a SSL, mientras que para el SSLC (150) esta actividad se redujo en más de un 95%. Al calentar el SSL se observó una reducción significativa en la AA% en el SSLC (140) ( $p < 0,05$ ; Tabla 13).

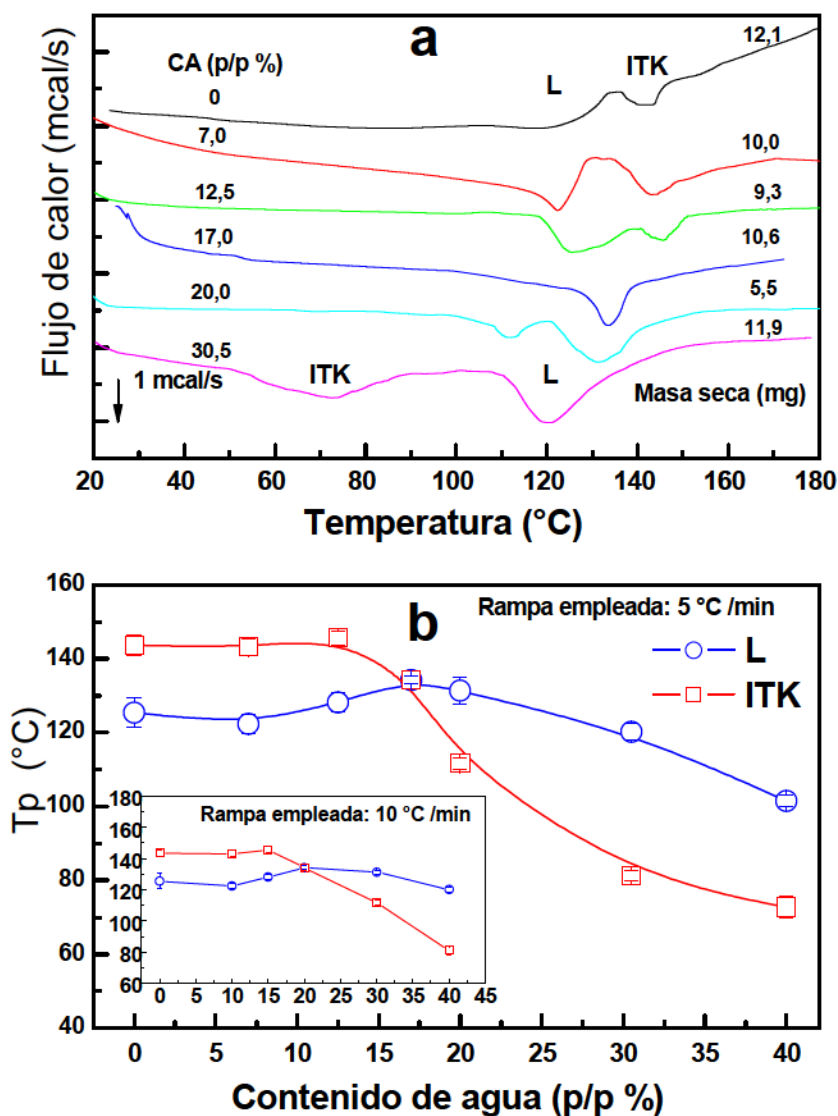
Además, los estudios por SDS-PAGE de SSL y SSLC (Sobral y Wagner, 2007a) permitieron comparar la estabilidad térmica con la tendencia a la agregación de las proteínas del suero liofilizado con la temperatura. Se vio que la agregación térmica seguía el orden:  $\beta$ -amilasa > L > ITK, teniendo el ITK menor tendencia a la agregación que la L. Analizando la intensidad de las bandas de los densitogramas de las SDS-PAGE se halló que para el SSLC (140) la intensidad de la banda L era del 49% (51% de agregados proteicos) mientras que para ITK dicha intensidad era de 80% (solo 20% de agregación).

Estos resultados muestran que el ITK se inactiva y agrega a temperaturas superiores a 140°C, temperatura que está por encima de la transición I atribuida a la L, sustentando que las transiciones I, II y III de la Figura 14 corresponden a la desnaturalización de L, ITK e ITBB, respectivamente.

### **4.1.2 Termogramas de SSL con diferentes contenidos de humedad**

En la Figura 15a se muestran los termogramas obtenidos con SSL a diferentes contenidos de humedad. Nótese que las  $T_p$  de los termogramas con 7,0 y 12,5% de agua son bastante coincidentes con las correspondientes a SSL en ausencia de agua (Figura 14) pero exhiben picos más definidos posiblemente debido a la presencia de agua.

## Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas



**Figura 15:** a) Termogramas de SSL en condiciones anhidras y a diferentes contenidos de humedad (7,0-30,5% p/p); junto a cada termograma se indica la masa seca (en mg) y el contenido de agua (CA) de cada ensayo. b) Efecto del contenido de agua (% p/p) sobre las ( $T_p$ , °C) del ITK en el SSL (curvas en rojo) y de la L en el SSL (curvas en azul). Rampas usadas de 5 y 10°C/min. para las figuras principales y el inserto respectivamente.

A 12,5% se aprecia con una mayor claridad que la transición de mayor entalpía se ubica a la menor temperatura. Con un 17,0% de agua la desnaturización de las proteínas de SSL ocurre en una única transición endotérmica. A contenidos de humedad superiores (>20% p/p) se comienza a observar una inversión en la relación de áreas entre el primer y el segundo pico, lo que podría en principio sugerir que, en estas condiciones el ITK se desnaturiza a temperaturas menores que L. Cuando el contenido de agua es suficientemente alto (30%) el valor  $T_p$  del primer pico resulta comparable con el informado por Sorgentini y Wagner (1999)

## ***Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas***

para dispersiones acuosas del ITK ( $T_p = 75,7^\circ\text{C}$ ; Tabla 15), lo cual permite concluir que en el SSL hidratado, ITK tiene menor estabilidad térmica que L.

Basado en esta evidencia y en los termogramas de SSL en condiciones anhidras (Figura 14) y con diferentes grados de hidratación (Figura 15a), en la Figura 15b se muestra el efecto del contenido de agua sobre las  $T_p$  del ITK y L en el SSL. Los valores de  $T_p$  para el caso de L son comparables entre sí cuando el contenido de agua se ubica entre el 0-20% con una tendencia decreciente cuando el contenido de agua supera el 20%. Cuando el contenido de agua alcanza el 40%, las  $T_p$  de ambas fracciones dan valores que son comparables a los publicados para dispersiones acuosas de PSS<sub>am-8</sub> al 20% p/p (Sorgentini y Wagner, 1999).

Estos resultados indican claramente que existe una inversión en las  $T_p$  de ambas fracciones debido a la fuerte influencia que tiene el agua en el comportamiento térmico del ITK. Mientras que esta proteína es térmicamente más estable en condiciones anhidras que L, se observa una rápida desestabilización del ITK cuando el contenido de agua se ubica entre el 15,0-16,0% p/p de agua.

En el inserto de la Figura 15b se puede ver que la misma tendencia hallada respecto a la inversión de estabilidad entre ITK y L con el contenido de agua hallada a  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ . también es encontrada cuando se utiliza una rampa de calentamiento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ . Las  $T_p$  obtenidas a  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ . son al menos  $5^\circ\text{C}$  más altas que las registradas a  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ . cuando el contenido de agua fue bajo (0-10,0% p/p). Sin embargo, la estabilidad térmica del ITK y L se invierten al mismo contenido de agua (15,0-20,0% p/p) independientemente de la velocidad de calentamiento aplicada.

Para el SSL con un contenido de agua entre el 0-20,0% p/p la entalpía total de desnaturalización de las proteínas se halla en el rango de 90-180 J/g proteína. Dichos valores son 5-10 veces más altos que los informados para la desnaturalización de las proteínas aisladas de suero de soja en soluciones acuosas diluidas (Sorgentini y Wagner, 1999). Estas diferencias pueden ser atribuidas a un efecto estabilizador de las sales y azúcares presentes en el SSL. Otros posibles factores que pueden contribuir a la estabilidad térmica de las proteínas de soja son la presencia de cationes divalentes (como el calcio y el magnesio), la alta fuerza iónica y la baja actividad acuosa (Sorgentini y Wagner, 1999; Scilingo y Añón, 1996).

Matsue y col. (2001) informaron un incremento en la entalpía de desnaturalización de la lisozima, en la medida que se incrementó la concentración de polioles, debido a una disminución

## *Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas*

en la actividad acuosa. Los datos termodinámicos sustentan la hipótesis que la estabilización térmica de las proteínas debido a polioles se debe a un efecto de interacción preferencial con el solvente, lo que refuerza las interacciones hidrofóbicas de la proteína. Los oligosacáridos presentes en el suero de soja pueden tener un efecto similar induciendo la estabilización térmica del ITK y L.

Un incremento en los valores de entalpía en las transiciones de estas proteínas puede también atribuirse a la formación de agregados vía glicosilación. Es importante resaltar que, durante el calentamiento térmico del SSL en condiciones anhidras suceden reacciones de glicosilación de forma simultánea o previa al proceso de desnaturalización que conducen a la formación de agregados en los que participan ITK y L.

Oste y col. (1990) informaron que se producen modificaciones en la conformación del ITK debido a reacciones del tipo Maillard, las cuales fueron detectadas durante el calentamiento de mezclas sólidas del ITK y azúcares a 120°C. Las sales y el nitrógeno no proteico ( $\approx 6,0\%$ , Tabla 7; sección 3.1) en SSL son factores que aceleran la reacción de Maillard.

Los altos valores de  $\Delta H$  en ausencia de agua o en condiciones de bajos contenidos de humedad también pueden ser atribuidos a la ruptura de puentes de hidrógeno y uniones covalentes en la estructura de la proteína (reacciones de desamidación, desulfuración o decarboxilación) cuando el calentamiento se lleva a cabo a temperaturas superiores a 100°C (Cheftel, 1989). La ruptura de uniones covalentes usualmente requiere aproximadamente 20 veces la cantidad de energía requerida para la ruptura de puentes de hidrógeno (Blanksby y Ellison, 2003). Además, Sheu y col. (2003) hallaron que, en condiciones anhidras la ruptura de puentes de hidrógeno requiere una mayor cantidad de energía (aproximadamente 5,0-6,0 Kcal/mol) que la requerida en presencia de agua (0,5-1,5 Kcal/mol).

En los ensayos de DSC con SSL hidratado la entalpía de desnaturalización total ( $\Delta H_{\text{total}}$ ) disminuye con el contenido de agua, dando una correlación lineal ( $\Delta H_{\text{total}} = 297,18 - 4,59 \times CA$ ;  $r = -0,9947$ ), en donde CA es el contenido de agua para el SSL. De acuerdo a esta correlación cuando el contenido de agua crece por encima del 60% p/p el efecto de los solutos (sales y azúcares) sobre el suero es despreciable ya que el  $\Delta H_{\text{total}}$  del SSL se ubica en el rango de 12-20 J/g proteína, que está en el orden de aquellos informados para dispersiones acuosas de proteínas de suero aisladas (Tabla 15).



## ***Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas***

Esta tendencia también fue observada por Sessa (1992) para las fracciones 7S y 11S en porotos quebrados y harinas de soja en un rango de contenidos de humedad entre el 4,0-65,0%.

### **4.2 Comportamiento térmico de proteínas de suero de soja**

#### **4.2.1 Comparación del comportamiento térmico de proteínas de suero de soja con un aislado nativo de soja**

Se utiliza ASN como muestra proteica de referencia ya que existe abundante información sobre el comportamiento térmico de proteínas de reserva de soja, que son las proteínas mayoritarias en el poroto de soja. El comportamiento térmico de los aislados proteicos de soja ha sido exhaustivamente estudiado (Petruccelli y Añón, 1984; Scilingo y Añón, 1996; Molina Ortiz y Añón, 2001; Hua y col., 2005 y Liu y col., 2008) habiéndose informado que, los termogramas de dispersiones acuosas al 20-30% están formados por dos endotermas correspondientes a la desnaturalización de  $\beta$ -conglucina (7S) y glicina (11S), con valores de  $T_p$  situados en el rango 74-79°C y 90-98°C, respectivamente, con importantes variaciones en los valores informados para la entalpía.

Comparativamente, el comportamiento térmico de las proteínas de suero de soja no ha recibido tanta atención habiendo relativamente pocos valores publicados sobre sus propiedades térmicas. Los hallazgos más importantes se detallan a continuación y serán empleados para discutir nuestros resultados.

Sorgentini y Wagner (1999) analizaron de manera comparativa el comportamiento térmico de ASN y una muestra PSS equivalente a nuestra PSS<sub>am-8</sub>, preparada a partir de harina desgrasada empleando una metodología similar. A partir de los termogramas de dispersiones acuosas al 20% de estas proteínas empleando una rampa de calentamiento de 10°C/min. obtuvieron los datos mostrados en la Tabla 14. Los resultados en esta tabla indican una concordancia entre las  $T_p$  de  $\beta$ -conglucina del ASN y la del ITK de PSS<sub>am-8</sub> y entre la glicina y la lectina.

En ensayos con dispersiones a distinta fuerza iónica ( $\mu$ ) Sorgentini y Wagner (1999) notaron que para ASN las endotermas de desnaturalización se corren notablemente a mayores

## *Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas*

temperaturas en la medida que  $\mu$  aumenta desde 0 a 1,0. Asimismo, para estas proteínas hallaron menores entalpías de desnaturalización entre  $0,2 < \mu < 0,5$  lo que fue atribuido al proceso de agregación exotérmico, el cual se opone a la entalpía de desnaturalización representada mayoritariamente por la ruptura de puentes de hidrógeno. Por el contrario, para PSS<sub>am-8</sub> estos autores hallaron solo un ligero incremento de las Tp con el aumento de  $\mu$  con valores de entalpía prácticamente constantes en el intervalo analizado, los cuales resultaron considerablemente menores que los hallados para ASN.

**Tabla 14:** Datos de termogramas de PSS<sub>am-8</sub> y ASN analizados en dispersiones acuosas (20% p/p; 10°C/min.), por Sorgentini y Wagner (1999). ASN: Aislado de soja nativo. PSS<sub>am-8</sub>: Proteínas de suero de soja precipitadas con sulfato de amonio a partir de suero de soja con el pH ajustado a 8,0.

Muestra	Transiciones térmicas				Entalpía de desnaturalización (J/g)
	Pico I		Pico II		
	Tp(°C)	Fracción	Tp(°C)	Fracción	
ASN	77,6 ± 1,2	7S	90,5 ± 1,6	11S	17,8 ± 0,8
PSS <sub>am-8</sub>	74,4 ± 0,5	ITK	90,4 ± 0,8	Lectina	10,8 ± 1,2

Mediante estos estudios DSC realizados sobre ASN y PSS<sub>am-8</sub> en agua y en NaCl 1,0M, Sorgentini y Wagner (1999) pudieron identificar las fracciones proteicas correspondientes a cada transición utilizando patrones de proteínas que presumiblemente estarían presentes en base a resultados electroforéticos, agregando además un control de ureasa. Los datos de estos ensayos se muestran en la Tabla 15.

Empleando una relación 7S: 11S de 2: 3 hallada para ASN junto a las entalpías de los controles de 7S y 11S, estos autores estimaron una entalpía teórica para el ASN de 17,3 J/g, la cual resulta similar a la hallada experimentalmente ( $17,1 \pm 0,8$  J/g, Tabla 15). Esta correspondencia les indicó que las fracciones 7S y 11S, que son las fracciones mayoritarias observadas por SDS-PAGE, se encuentran en estado nativo.

Mientras que para las PSS<sub>am-8</sub>, empleando una relación ITK: L de 3: 2 hallaron un valor teórico de  $\Delta H$  (18,0 J/g) el cual fue significativamente mayor al de la Tabla 15, indicando que las PSS<sub>am-8</sub> son susceptibles a los procesos preparativos y sufren un grado de desnaturalización superior al 40%.

## *Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas*

En esta tabla se observa claramente lo mencionado anteriormente, que un aumento de la fuerza iónica de 0 a 1,0 M incrementa los valores de  $T_p$  de 7S y 11S en más de 20°C en tanto que este incremento para las proteínas de suero de soja no supera los 7°C.

**Tabla 15:** Datos de termogramas de dispersiones acuosas de ASN y PSS<sub>am-8</sub> (20% p/p; 10°C/min.) con y sin NaCl 1,0 M y sus fracciones proteicas constitutivas realizadas por Sorgentini y Wagner (1999). Las abreviaturas usadas son las de la Tabla 14. 7S:  $\beta$ -conglucina. 11S: glicina.

Muestras	Agua		NaCl 1M	
	$T_p$ (°C)	Entalpía (J/g)	$T_p$ (°C)	Entalpía (J/g)
ASN	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 <sub>am-8</sub>	74,0 ± 0,3; 90,4 ± 0,8	10,8 ± 1,2	81,7 ± 0,5; 92,9 ± 0,6	11,2 ± 1,5
ITK	75,7 ± 0,1	13,6 ± 0,5	82,5 ± 0,1	14,4 ± 0,2
L	92,8	24,6 ± 0,4	95,6	24,4 ± 0,5
ITBB	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

La mayor estabilización de las proteínas de reserva a alta fuerza iónica la atribuyen a la formación de agregados más estables por interacciones hidrofóbicas, debido a un fuerte aumento de la hidrofobicidad superficial en estas proteínas al incrementarse la concentración de NaCl, lo cual no fue observado en las proteínas de suero (Sorgentini y Wagner, 1999).

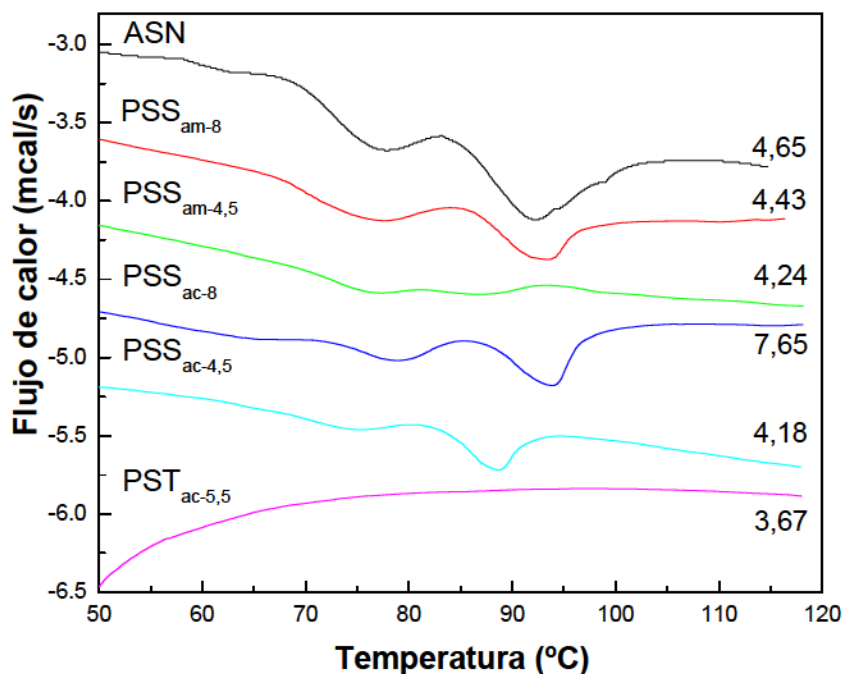
### **4.2.2 Efectos de la preparación y tratamientos sobre el comportamiento térmico de proteínas aisladas de suero de soja**

*4.2.2.1 Efecto del método de preparación:* Los termogramas correspondientes a las muestras PSS analizados en este trabajo junto con un termograma de ASN como control se muestran en la Figura 16 y los datos de estos en la Tabla 16.

*Sobre las proteínas aisladas por salting out:* Comenzaremos analizando las proteínas aisladas por *salting out* tomando como referencia a PSS<sub>am-8</sub> por ser la proteína más nativa con el valor más alto de entalpía ( $p < 0,05$ ; Tabla 16). Respecto a los datos de la Tabla 15, nuestra PSS<sub>am-8</sub>

## Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas

presenta un  $\Delta H \approx 20\%$  menor pero Tp I y II superiores (1-2°C); estas variaciones pueden atribuirse a diferencias en las materias primas de partida ya que la metodología empleada es la misma. PSS<sub>am-8</sub> y PSS<sub>am-4,5</sub> fueron preparadas a partir de la misma harina pero ajustando el pH del SS a valores diferentes antes de hacer la precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 90% de saturación.



**Figura 16:** Termogramas de dispersiones acuosas de proteínas aisladas (30% p/p; 5°C/min.) PSS: Proteínas de suero de soja. am: Precipitación con sulfato de amonio. ac: Precipitación con acetona. Se indica el pH del SS previo al aislamiento y junto a cada termograma la masa seca (en mg) de cada ensayo. PST<sub>ac-5,5</sub>: Proteínas de suero de tofu precipitada con acetona. ASN: definido en Tabla 14.

**Tabla 16:** Datos correspondientes a los termogramas mostrados en la Figura 16.

Muestras de PSS	Comportamiento térmico			
	Tp I (°C)	Tp II (°C)	$\Delta H$ (J/g)	Relación de áreas I/II (%)
PSS <sub>am-8</sub>	76,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	91,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	8,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	~50
PSS <sub>am-4,5</sub>	77,7 ± 1,2 <sup>b</sup>	85,1 ± 0,4 <sup>b</sup>	5,7 ± 0,5 <sup>b</sup>	~60
PSS <sub>ac-8</sub>	76,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	92,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,6 ± 0,3 <sup>c</sup>	40-50
PSS <sub>ac-4,5</sub>	74,4 ± 0,3 <sup>c</sup>	88,5 ± 0,2 <sup>c</sup>	7,0 ± 0,6 <sup>c</sup>	~50

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



## *Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas*

La precipitación desde un SS ácido da como resultado un aumento significativo de Tp I y una reducción significativa de Tp II y en la entalpía de desnaturalización (referencia PSS<sub>am-8</sub>,  $p < 0,05$ ; Tabla 16), indicando que el pH ácido induce una mayor desnaturalización proteica con un aumento de la estabilidad del ITK y una reducción en la estabilidad de L.

Por otra parte, el aumento de la relación de áreas I/(I+II) en PSS<sub>am-4,5</sub> ( $\approx 60\%$ , Tabla 16) sugiere que L además de disminuir su estabilidad también sería la fracción proteica que sufre un mayor grado de desnaturalización.

*Sobre las proteínas precipitadas con solvente:* Las proteínas aisladas con acetona a ambos pH presentan entalpías de desnaturalización significativamente menores que las de PSS<sub>am-8</sub> sin cambios apreciables en la relación de áreas ( $p < 0,05$ ; Tabla 16).

Una comparación entre PSS<sub>am-8</sub> y PSS<sub>ac-8</sub> permite ver que no hay variaciones significativas en las Tp o en las relaciones de áreas pero si una reducción en la entalpía de desnaturalización ( $p < 0,05$ ; Tabla 16). Estos resultados sugieren que la precipitación con solvente produciría una mayor desnaturalización que la precipitación con sulfato de amonio. En PSS<sub>ac-4,5</sub> donde se combina la precipitación con solvente con el pH ácido del SS que reduce la estabilidad térmica de la L, se obtiene un termograma con una Tp II significativamente menor que la hallada con PSS<sub>am-8</sub>.

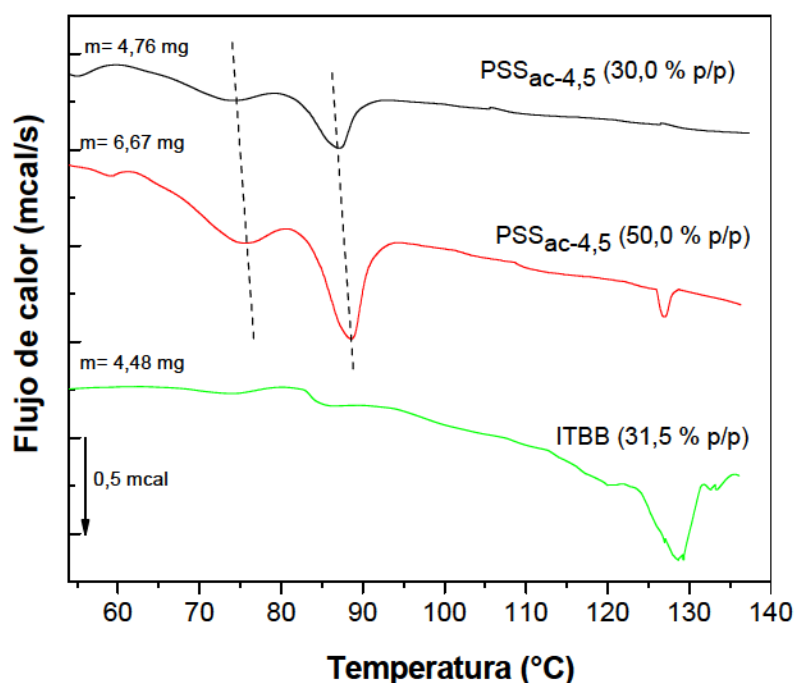
Cabe mencionar que las entalpías en la Tabla 16 están dadas en J/g materia seca, si se consideran los contenidos de proteína en las diferentes muestras (Tabla 9, sección 3.2) se obtiene que de hecho las entalpías por gramo de proteína resultan mayores para las proteínas aisladas con solvente respecto a las precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Para PSS<sub>ac-8</sub> con un porcentaje de proteína  $\approx 57\%$  se obtiene una entalpía  $\approx 13,4$  J/g de proteína valor que es superior al de PSS<sub>am-8</sub> de 8,7 J/g de proteína. Los valores de entalpía para PSS<sub>am-4,5</sub> y PSS<sub>ac-4,5</sub> son de 6,4 y 12,9 J/g de proteína, respectivamente. Cabe mencionar que, pese a la corrección debida al contenido de proteína, PSS<sub>am-4,5</sub> tiene una entalpía significativamente menor respecto a PSS<sub>am-8</sub>, mientras que las entalpías de PSS<sub>ac-8</sub> y PSS<sub>ac-4,5</sub> resultan comparables con valores menores para esta última, manteniendo la tendencia hallada en la Tabla 16 respecto al mayor grado de desnaturalización de las proteínas aisladas desde SS ácido. Durante la precipitación con acetona en frío son muy importantes los cuidados en las condiciones operativas y resulta particularmente importante mantener baja la temperatura

## Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas

durante todo el proceso a fin de prevenir que la desnaturalización alcance valores substanciales.

Cuando PSS<sub>ac-4,5</sub> es analizada a una mayor concentración se observa un aumento en las T<sub>p</sub> debido a la reducción en la cantidad de agua y un incremento en la entalpía de desnaturalización. Adicionalmente y debido a la mayor cantidad de muestra colocada dentro de la cápsula es posible identificar una transición adicional correspondiente a la desnaturalización del ITBB. En la Figura 17 el termograma superior corresponde a una dispersión acuosa (30% p/p) de PSS<sub>ac-4,5</sub> que presenta dos transiciones con T<sub>p</sub> de  $74,4 \pm 0,3$  y  $88,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$  (Tabla 16) que corresponden a la desnaturalización del ITK y L, respectivamente, con un  $\Delta H_{\text{total}}$  de  $6,98 \pm 0,23$  J/g materia seca. El análisis de esta misma muestra pero a una mayor concentración (50% p/p) presenta un valor  $\Delta H_{\text{total}}$  de  $7,12 \pm 0,52$  J/g con temperaturas de pico de  $76,2 \pm 0,9$  y  $89,3 \pm 0,8^\circ\text{C}$ , para ITK y L, respectivamente.



**Figura 17:** Termogramas de dispersiones acuosas al 30 y 50% de PSS<sub>ac-4,5</sub> y de un patrón comercial del ITBB a  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ . ITBB: Factor antitriptico de Bowman-Birk. Se indica la masa seca (en mg) dentro de cada cápsula.

Nótese que el aumento en la entalpía de desnaturalización debido a esta reducción en el contenido de agua no es suficiente para producir un cambio significativo en la entalpía de desnaturalización o en la T<sub>p</sub> II correspondiente a L. Sin embargo el aumento en la T<sub>p</sub> I de casi

## *Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas*

2°C correspondiente al ITK es suficiente para ser significativo y da cuenta de la mayor dependencia de la estabilidad térmica de esta fracción proteica con el contenido de agua.

El comportamiento hallado en el SSL con diferentes contenidos de humedad (sección 4.1.2) también se cumple con proteínas aisladas. Los corrimientos en las  $T_p$  debidos al cambio en el contenido de humedad se muestran en la Figura 17 con líneas verticales de puntos. Una mayor cantidad de muestra permite la detección de un pequeño pico a 126,9°C ( $\Delta H = 1,25$  J/g) que es atribuido a la desnaturalización del ITBB con base en la semejanza entre la  $T_p$  de esta nueva transición y la  $T_p$  de un patrón comercial de ITBB mostrado en el termograma inferior. El termograma de una dispersión al 30% p/p de un patrón comercial del ITBB da una transición a 128,8°C con un  $\Delta H$  de 9,2 J/g.

La materia prima de partida (harina de soja no tratada térmicamente) y la ausencia de tratamientos desnaturalizantes durante la obtención de PSS<sub>ac-4,5</sub>, justifica termogramas con las tres endotermas correspondientes a la presencia de L y ambos factores antitripticos (ITK e ITBB) sin desnaturalizar.

*4.2.2.2 Efecto del almacenamiento:* En esta sección se analizan los cambios producidos sobre las proteínas preparadas realizando las modificaciones preparativas detalladas en la Tabla 6.

*Efecto del almacenamiento del suero isoeléctrico:* En la parte superior de la Tabla 17 se presentan los datos de los termogramas correspondientes a PSS<sub>am-8</sub><sup>(4s, -20C)</sup>, PSS<sub>am-8</sub><sup>(1s, 10C)</sup> y PSS<sub>am-8</sub><sup>(4s, 10C)</sup>. Estas proteínas fueron preparadas de manera equivalente a PSS<sub>am-8</sub> a partir de una harina fresca pero luego de realizar un almacenamiento del suero isoeléctrico durante una (1s) o 4 semanas (4s) en estado congelado (-20°C) o de refrigeración (10°C). Respecto a PSS<sub>am-8</sub> no se encuentran diferencias significativas en las  $T_p$  de las transiciones pero si cambios en el  $\Delta H_{total}$  y la relación de áreas I/I+II.

Para PSS<sub>am-8</sub><sup>(4s, -20C)</sup> no se observan cambios significativos en el  $\Delta H_{total}$  ni en la relación I/I+II, por el contrario en las PSS<sub>am-8</sub><sup>(1s, 10C)</sup> y PSS<sub>am-8</sub><sup>(4s, 10C)</sup> se observa una reducción en la relación de áreas. Adicionalmente se halla un aumento en el grado de desnaturalización con el tiempo de almacenamiento del suero isoeléctrico en condiciones de refrigeración. El  $\Delta H_{total}$  de PSS<sub>am-8</sub><sup>(4s, 10C)</sup> es significativamente menor que las entalpías de desnaturalización halladas para PSS<sub>am-8</sub><sup>(1s, 10C)</sup> y PSS<sub>am-8</sub> ( $p < 0,05$ ; Tabla 17).

## *Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas*

**Tabla 17:** Datos de termogramas de dispersiones acuosas proteicas (30% p/p; 5°C/min.) Las proteínas fueron obtenidas con las modificaciones detalladas en la Tabla 6. En la parte superior de la tabla se analiza el efecto de almacenar el suero. Los supraíndices indican las condiciones de almacenamiento. s: Semanas. En la parte inferior se analiza el efecto del almacenamiento de la harina. Los supraíndices indican los años de almacenamiento de la harina. Se incluyen los datos de las respectivas proteínas no modificadas de la Tabla 16 para comparar.

Muestras de PPS	Almacenamiento		Comportamiento térmico			
	de la harina	del suero a pH 4,5	Tp I (°C)	Tp II (°C)	ΔH (J/g)	Relación de áreas I/II (%)
PSS <sub>am-8</sub>	No	No	76,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	91,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	8,5 ± 0,5 <sup>a,b</sup>	~50
PSS <sub>am-8</sub> <sup>(4s, -20C)</sup>	No	Si	75,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	91,8 ± 0,9 <sup>a</sup>	9,1 ± 0,8 <sup>a</sup>	~50
PSS <sub>am-8</sub> <sup>(1s, 10C)</sup>	No	Si	76,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	92,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	7,9 ± 0,3 <sup>b</sup>	35-40
PSS <sub>am-8</sub> <sup>(4s, 10C)</sup>	No	Si	76,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	92,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,2 <sup>c</sup>	35-40
PSS <sub>ac-8</sub>	No	No	76,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	92,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,6 ± 0,3 <sup>b</sup>	40-50
PSS <sub>ac-8</sub> <sup>(H2)</sup>	Si	No	77,8 ± 0,1 <sup>b</sup>	95,7 ± 0,4 <sup>b</sup>	5,8 ± 0,3 <sup>d</sup>	20-30
PSS <sub>ac-8</sub> <sup>(H8)</sup>	Si	No	78,4 ± 0,1 <sup>c</sup>	95,6 ± 0,3 <sup>b</sup>	3,7 ± 0,2 <sup>c</sup>	~10
PSS <sub>ac4,5</sub>	No	No	74,4 ± 0,3 <sup>d</sup>	88,5 ± 0,2 <sup>c</sup>	7,0 ± 0,6 <sup>b</sup>	~50
PSS <sub>ac-4,5</sub> <sup>(H8)</sup>	Si	No	80,3 ± 1,0 <sup>e</sup>	90,1 ± 0,5 <sup>d</sup>	4,3 ± 0,3 <sup>e</sup>	~40

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes (p<0,05).

**Tabla 18:** Contenido de minerales y cenizas en proteínas aisladas. CE: Conductividad eléctrica en dispersiones acuosas (0,05% p/v). La nomenclatura de las muestras es la dada en la Figura 16 y Tabla 17.

Muestra	CE (μS)	Ceniza (mg/g)	Ca (mg/g)	Mg (mg/g)
PSS <sub>am-8</sub>	8,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>a</sup>
PSS <sub>am-8</sub> <sup>(4s, -20C)</sup>	21,9 ± 1,6 <sup>b</sup>	19 ± 2 <sup>b</sup>	2,20 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,20 ± 0,02 <sup>a</sup>
PSS <sub>am-8</sub> <sup>(4s, 10C)</sup>	35,8 ± 5,4 <sup>c</sup>	30 ± 2 <sup>c</sup>	1,40 ± 0,05 <sup>c</sup>	0,18 ± 0,02 <sup>a</sup>

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes (p<0,05).

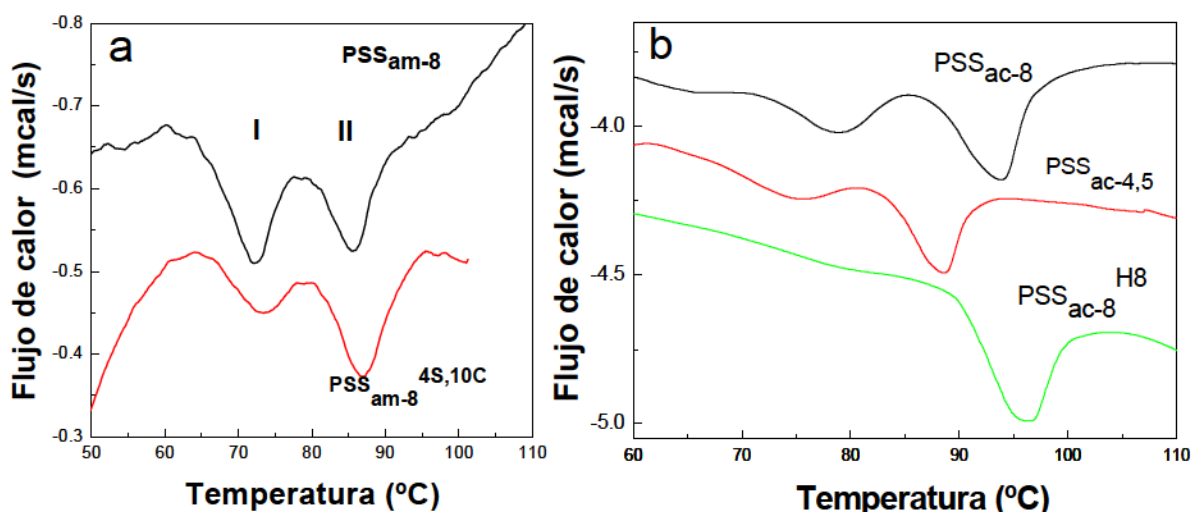
Un análisis del contenido salino de estas muestras permite ver que el almacenamiento del suero, tanto a temperatura de refrigeración como en estado congelado, induce la asociación de sales a las proteínas del suero de soja, ya que el contenido salino (reflejado en valores de



## Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas

conductividad y cenizas) y el contenido de calcio se ven aumentados en las muestras PSS<sub>am-8</sub> resultantes (Tabla 18). Sin embargo, este aumento en el contenido salino si bien es significativo, no lo es para inducir cambios en la estabilidad térmica de IKT y L.

En la Figura 18a se muestran los termogramas de PSS<sub>am-8</sub><sup>(4s, 10C)</sup> y PSS<sub>am-8</sub>; nótese que las Tp para ambas proteínas se ubican a la misma temperatura pero que el almacenamiento refrigerado durante 4 semanas del suero antes de realizar el aislamiento tiene un efecto desnaturalizante lo que se refleja en transiciones de menor tamaño.



**Figura 18:** a) Termogramas de dispersiones acuosas de proteínas (30% p/p; 5°C/min.) Las proteínas fueron obtenidas modificando la harina de partida o realizando cambios durante su obtención. a) Almacenamiento del suero isoeléctrico. b) Almacenamiento de la harina. La nomenclatura usada es la de la Figura 16 y la Tabla 17.

*Efecto del almacenamiento de la harina:* Cuando se parte de una harina desgrasada almacenada se obtienen proteínas aisladas con acetona con valores de Tp I y II significativamente mayores que los correspondientes a aquellas preparadas desde harinas no almacenadas, independientemente del pH del SS de partida ( $p < 0,05$ ; Tabla 17). Por el contrario, el  $\Delta H_{total}$  de las proteínas obtenidas a partir de harinas almacenadas es significativamente menor que el de las proteínas de harina fresca, hallándose una reducción en la relación de áreas ( $p < 0,05$ ; Tabla 17).

En PSS<sub>ac-8</sub><sup>(H2)</sup> se observa un incremento de 1,6 y 3,7°C en Tp I y II respecto a los valores en PSS<sub>ac-8</sub> y en la PSS<sub>ac-8</sub><sup>(H8)</sup> el incremento de Tp I es mayor (2,2°C). Estos cambios producidos por el almacenamiento de la harina, a diferencia de lo que se observó en las muestras resultantes de sueros almacenados, pueden relacionarse con un incremento en el contenido

## ***Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas***

salino. La muestra PSS<sub>ac-8</sub><sup>(H2)</sup> resulta tener contenidos de cenizas y calcio (expresados en mg/g) de  $174 \pm 9$  y  $27,10 \pm 0,10$  respectivamente, valores que corresponden a 3,5 y 4,2 veces a los correspondientes valores en PSS<sub>ac-8</sub>. El valor CE en cambio solo es 1,3 veces superior en la muestra PSS<sub>ac-8</sub><sup>(H2)</sup>. Estos resultados indican que el almacenamiento de la harina por tiempos prolongados contribuye a la asociación de las sales (principalmente de calcio) con las proteínas del grano, resultado que se ve reflejado en el contenido de las mismas al ser aisladas. La baja contribución al valor CE indica que las sales están poco disociadas y por ende se encuentran formando complejos con las proteínas de suero de soja, lo cual explica el marcado incremento en sus temperaturas de desnaturalización.

Adicionalmente el almacenamiento de la harina de partida produce una reducción en el  $\Delta H_{total}$ , llegando en la muestra PSS<sub>ac-8</sub><sup>(H8)</sup> a menos de la mitad del valor en PSS<sub>ac-8</sub>; también se reduce la relación de áreas entre 4 y 5 veces. En la Figura 18b, se observan los termogramas de estas proteínas en donde se aprecia el incremento en las Tp y la marcada desnaturalización sobre todo del ITK. En PSS<sub>ac-4,5</sub><sup>(H8)</sup> el aumento en Tp I y II es de 5,9 y 1,6°C (referencia PSS<sub>ac-4,5</sub>) con un menor grado de desnaturalización.

Una comparación entre PSS<sub>ac-4,5</sub><sup>(H8)</sup> y PSS<sub>ac-8</sub><sup>(H8)</sup> permite ver que para un mismo tiempo de almacenamiento de la harina las proteínas aisladas a pH ácido presentan Tp I 1,9°C mayor y Tp II 5,5°C menor que los hallados para PSS<sub>ac-8</sub><sup>(H8)</sup> ( $p < 0,05$ ; Tabla 17).

Estos resultados en conjunto indican que el almacenamiento produce una mayor desnaturalización del ITK (respecto de L) con una simultánea estabilización de ambas proteínas constitutivas.

De acuerdo a trabajos previos (Sorgentini y Wagner, 1999 y Sobral y Wagner, 2007a) y a los datos de la Tabla 16, PSS<sub>am-8</sub> y PSS<sub>ac-8</sub> resultan muestras proteicas representativas de ambas metodologías de obtención y pueden ser tomadas como referencia debido a sus elevadas entalpías de desnaturalización y por estar constituidas según los estudios por SDS-PAGE (sección 3.4) por cantidades similares de sus dos fracciones principales, L e ITK.

*4.2.2.3 Efecto del almacenamiento de las proteínas aisladas:* Se analiza el efecto del almacenamiento de las proteínas aisladas en condiciones controladas. Por un lado se evalúa un almacenamiento prolongado (9 años) sobre las proteínas aisladas preparadas con modificaciones preparativas que no cambiaron en gran medida los termogramas, como es el

## *Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas*

caso de PSS<sub>am-8</sub><sup>(4s, -20C)</sup> y PSS<sub>am-8</sub><sup>(1s, 10C)</sup>. Ambas proteínas no exhiben cambios en las Tp I o II y solo para la última se halló una reducción en la relación de áreas (referencia PSS<sub>am-8</sub>) Tabla 17.

Por otra parte se analiza el efecto de un almacenamiento corto (1 año) sobre PSS<sub>ac-4,5</sub> ya que se trata de una de las muestras proteicas con la mayor entalpía (en J/g proteína) que combina la precipitación con solvente y el pH ácido del SS que produce la mayor reducción en la estabilidad térmica del ITK (p<0,05; Tabla 16).

Los resultados de estos ensayos de almacenamiento se muestran en la Tabla 19 en la que se han incluido para comparar los datos correspondientes a las mismas proteínas sin almacenar.

El almacenamiento durante 9 años de las proteínas aisladas produce los mismos cambios para PSS<sub>am-8</sub><sup>(4s, -20C)</sup> y PSS<sub>am-8</sub><sup>(1s, 10C)</sup> que corresponden a un proceso de desnaturalización acompañado de un aumento significativo en la Tp I sin cambios apreciables en la Tp II o en la relación de áreas (p<0,05; Tabla 19).

**Tabla 19:** Datos correspondientes a termogramas de dispersiones acuosas proteicas (30% p/p; 5°C/min.) Las proteínas fueron almacenadas dentro de frascos cerrados a 4°C. <sup>(\*)</sup> y <sup>(\*\*)</sup>: Almacenamiento durante 1 y 9 años respectivamente La nomenclatura usada es la de la Figura 16 y la Tabla 17.

Muestras de PPS	Almacenamiento de SSL a 4°C (años)	Comportamiento térmico			
		Tp I (°C)	Tp II (°C)	ΔH (J/g)	Relación de áreas I/I+II (%)
PSS <sub>am-8</sub> <sup>(4s, -20C)</sup>	0	75,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	91,8 ± 0,9 <sup>a</sup>	9,1 ± 0,8 <sup>a</sup>	~50
PSS <sub>am-8</sub> <sup>(4s, -20C) (**)</sup>	9	78,0 ± 0,8 <sup>b</sup>	91,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,6 <sup>b</sup>	~50
PSS <sub>am-8</sub> <sup>(1s, 10C)</sup>	0	76,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	92,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	7,9 ± 0,3 <sup>b</sup>	35-40
PSS <sub>am-8</sub> <sup>(1s, 10C) (**)</sup>	9	77,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	91,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	6,6 ± 1,0 <sup>b</sup>	35-40
PSS <sub>ac-4,5</sub>	0	74,4 ± 0,3 <sup>c</sup>	88,5 ± 0,2 <sup>b</sup>	7,0 ± 0,6 <sup>b</sup>	~50
PSS <sub>ac-4,5</sub> <sup>(*)</sup>	1	74,3 ± 0,5 <sup>c</sup>	88,8 ± 0,8 <sup>b</sup>	3,3 ± 0,3 <sup>c</sup>	~40

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes (p<0,05).

Esto indica que el almacenamiento de las proteínas aisladas induce un proceso de desnaturalización similar entre las fracciones con un aumento de la estabilidad del ITK. Estudios previos (Sobral y Wagner, 2007a) de almacenamiento del SSL a T<Tg y su posterior

## ***Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas***

análisis por DSC en dispersiones acuosas al 30% p/p confirmó que el almacenamiento del SSL también produce desnaturalización proteica pero de manera selectiva y mucho más acelerada. Luego de  $\approx 300$  días de almacenamiento se halló en el SSL una desnaturalización del  $\approx 70$  y  $\approx 50\%$  para ITK y L respectivamente obteniéndose una recta ( $r = 0,99$ ) que indica la total desnaturalización de ambas fracciones luego de 540 y 620 días para ITK y L respectivamente. La mayor velocidad de desnaturalización hallada en el SSL almacenado fue atribuida al alto porcentaje de azúcares los cuales se recristalizan produciendo desnaturalización proteica. Finalmente el almacenamiento de PSS<sub>ac-4,5</sub> no produce cambios en las T<sub>p</sub> pero si una significativa reducción en la entalpía ( $p < 0,05$ ; Tabla 19). Los resultados en conjunto indican que el almacenamiento produce la desnaturalización proteica en todos los casos.

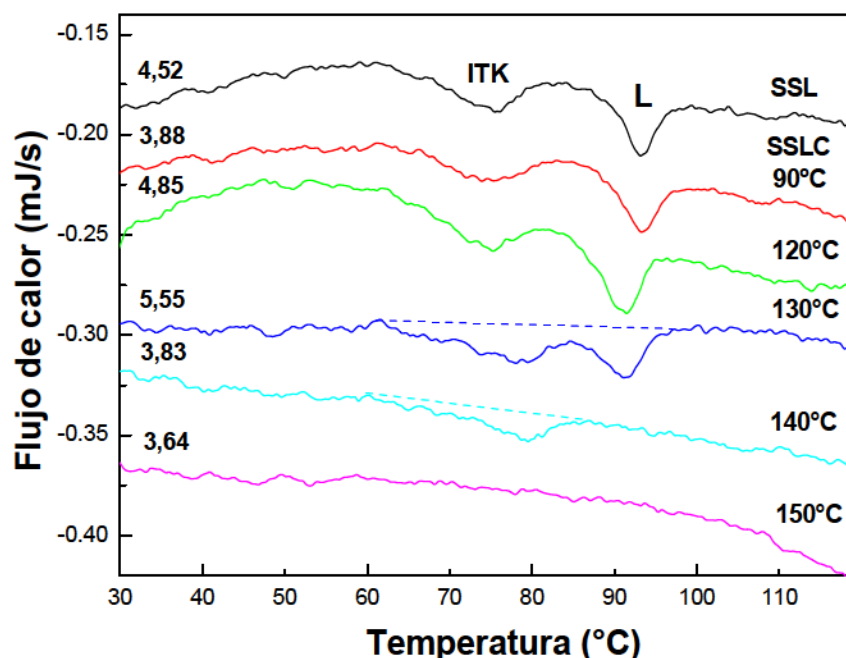
*4.2.2.4 Efecto del calentamiento de SSL sobre el comportamiento térmico de sus proteínas aisladas:* Los DSC de dispersiones acuosas de proteínas aisladas (sección 2.6.2) a partir de SSLC (90-180°C) se muestran en la Figura 19 mientras que los datos correspondientes a dichos termogramas se presentan en la Tabla 20.

En la medida que el tratamiento térmico del SSL se vuelve más enérgico se observa un ligero aumento en las T<sub>p</sub> del ITK y una disminución en las T<sub>p</sub> de L (Tabla 20). Si la T<sub>p</sub> dependiera exclusivamente del estado de agregación de la proteína se debería esperar un aumento para ambas fracciones. El comportamiento hallado para L puede atribuirse a cambios conformacionales producidos por la glicosilación.

Se hace evidente que, cuando el calentamiento del SSL es suave como en el SSLC (90) no hay desnaturalización de la L pero si glicosilación (sección 3.2.2), mientras que con tratamientos térmicos de mayor intensidad hay desnaturalización de ambas fracciones proteicas, registrándose un mayor grado de desnaturalización para la L respecto del ITK (Tabla 20). En la Figura 19 la inclusión de líneas de base permite apreciar mejor que la transición correspondiente a L en las proteínas aisladas del SSLC (130) es notablemente más chica que la hallada para 120°C teniendo ambas transiciones tamaños similares. Mientras que en los termogramas de las proteínas del SSLC (140) L está totalmente desnaturalizada (GD= 100%) mientras que aún queda sin desnaturalizar  $\approx 40\%$  del ITK (GD  $\approx 60\%$ ).



## Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas



**Figura 19:** Termogramas de dispersiones acuosas de proteínas aisladas (30% p/p; 5°C/min.) Las proteínas fueron aisladas con acetona en frío a partir de dispersiones acuosas de SSL o SSLC (90-180°C) calentado en condiciones anhidras. Se indica junto a cada termograma la masa de proteínas y el tratamiento térmico aplicado al SSL.

**Tabla 20:** Datos correspondientes a los termogramas de la Figura 19. El grado de desnaturalización (GD) de las proteínas fue calculado como:  $[100 \times (\Delta H_0 - \Delta H) / \Delta H_0]$ .  $\Delta H_0$ : entalpía de las proteínas aisladas desde el SSL.  $\Delta H$ : Entalpía de las proteínas aisladas desde SSLC (90-180°C). n.d.: No detectable.

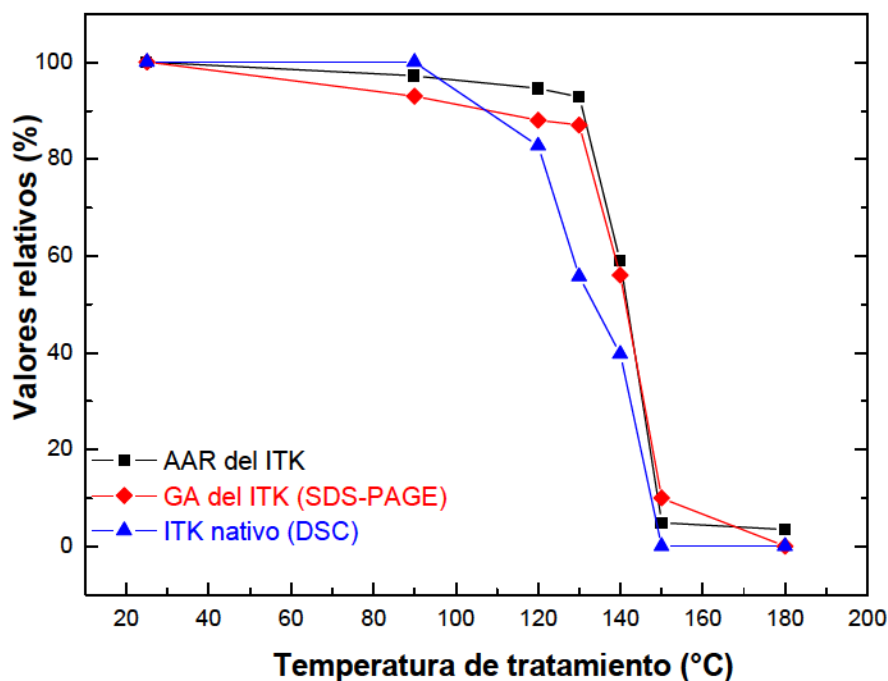
Muestra	Inhibidor de la tripsina de Kunitz			Lectina		
	Tp (°C)	Entalpía (J/g proteína)	GD (%)	Tp (°C)	Entalpía (J/g proteína)	GD (%)
PSSL	74,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	2,08 ± 0,21 <sup>a</sup>	0	93,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,08 ± 0,12 <sup>a</sup>	0
PSSLC (90)	75,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,92 ± 0,12 <sup>a</sup>	7,7	95,7 ± 1,1 <sup>b</sup>	2,34 ± 0,24 <sup>a</sup>	0
PSSLC (120)	75,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,72 ± 0,06 <sup>b</sup>	17,3	91,3 ± 0,1 <sup>c</sup>	1,64 ± 0,41 <sup>b</sup>	21,2
PSSLC (130)	78,6 ± 0,4 <sup>c</sup>	1,16 ± 0,40 <sup>c</sup>	44,2	91,8 ± 0,7 <sup>c</sup>	0,90 ± 0,14 <sup>c</sup>	56,7
PSSLC (140)	79,8 ± 0,2 <sup>d</sup>	0,82 ± 0,32 <sup>c</sup>	60,6	n.d.	n.d.	100
PSSLC (150)	n.d.	n.d.	100	n.d.	n.d.	100

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Esto demuestra una mayor estabilidad térmica del ITK respecto a L al calentar el SSL en condiciones de deshidratación (Sobral y Wagner, 2007a) y sustenta aún más que las transiciones I, II y III de la Figura 14 corresponden a la desnaturalización de L, ITK e ITBB, respectivamente.

## Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas

En la Figura 20 se compilan en forma conjunta los resultados obtenidos de los estudios DSC (Tabla 20), el grado de agregación obtenido por SDS-PAGE (Sobral y Wagner, 2007) y la actividad antitriptica de SSL y SSLC (90-180°C), sección 3.3.1.



**Figura 20:** AAR: Actividad antitriptica relativa.  $AAR = 100 \times AA/AA_0$ . AA: Actividad antitriptica de una muestra sometida a tratamiento térmico.  $AA_0$ : Actividad antitriptica de la misma muestra no calentada. GA: Grado de agregación.  $GA = 100 \times I/I_0$ . I: Intensidad de la banda del ITK sometida a tratamiento térmico.  $I_0$ : Intensidad de la misma banda correspondiente a la muestra no calentada obtenidas a partir de densitogramas de SDS-PAGE de SSL y SSLC (90-180°C, datos de Sobral y Wagner, 2007a) ITK nativo (%):  $100 - GD$ . GD: grado desnaturalización del ITK definido en la Tabla 20.

Puede observarse que la desnaturalización del ITK es previa a su agregación, dado que cuando se alcanza la desnaturalización total a 150°C resta un 10% sin agregar. Mientras que cuando se alcanza la agregación-desnaturalización total del ITK a 180°C queda aún una actividad antitriptica remanente entre el 3 y el 4%. Esta actividad residual es debida al factor ITBB cuya estabilidad térmica es muy superior (referencia ITK). Por lo dicho, se puede confirmar que en condiciones anhidras las transiciones I, II y III (Figura 14) corresponden a la desnaturalización de L, ITK e ITBB, respectivamente.

## *Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas*

### **4.2.3 Comportamiento térmico de las proteínas del suero de tofu**

Como se detalló en 2.5.2 se obtuvieron precipitando en forma directa con acetona: PSS<sub>ac-4,5</sub> a partir de SS y PST<sub>ac-5,5</sub> desde el ST, en ambos casos sin realizar ajustes adicionales del pH. Los termogramas de dispersiones acuosas de estas proteínas se mostraron en la Figura 16.

A diferencia de PSS<sub>ac-4,5</sub> en donde es posible identificar con facilidad las transiciones correspondientes a la desnaturalización del ITK y L, en las PST<sub>ac-5,5</sub> esto no ocurre. Sin embargo tras ampliar y analizar detalladamente con el software del calorímetro varios termogramas de PST<sub>ac-5,5</sub> fue posible identificar dos pequeñas transiciones con valores de T<sub>p</sub> según se detallan en la Tabla 21. Extendiendo las corridas hasta mayores temperaturas fue posible identificar otra transición a  $138,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$  que fue atribuida a la presencia del ITBB no desnaturalizado. En la Figura 17 se mostró el termograma de un patrón comercial de ITBB (T<sub>p</sub>: 128,8°C; ΔH: 9,2 J/g) mientras que en dispersiones acuosas al 50% de PSS<sub>ac-4,5</sub> dicho factor fue hallado a 126,9°C (ΔH = 1,25 J/g). El incremento en la T<sub>p</sub> del ITBB en PST<sub>ac-5,5</sub> puede atribuirse a la presencia de sales. En el proceso industrial de obtención del tofu se adicionan sales de calcio y/o magnesio que precipitan junto con las proteínas 7S y 11S; sin embargo parte de estas sales pasan al ST y es la razón por la cual el ST tiene una cantidad de cenizas significativamente mayor que la hallada en SS. Estas sales de cationes divalentes presentes en el ST durante el proceso de insolubilización con acetona pueden coprecipitar junto con las PST<sub>ac-5,5</sub> provocando una estabilización adicional del ITBB.

En 3.2 se vio que los contenidos de cenizas y calcio en PST<sub>ac-5,5</sub> fueron significativamente mayores a los de PSS<sub>ac-4,5</sub>. Trabajos previos hacen referencia al efecto que tiene el calcio de incrementar la temperatura de desnaturalización de las globulinas de soja (Scilingo y Añón, 1996) y un efecto similar podría ser esperable para el ITBB. Las determinaciones de cenizas, calcio y magnesio realizadas en estas proteínas mostraron que PST<sub>ac-5,5</sub> tiene un contenido de cenizas y calcio mayor que el hallado en PSS<sub>ac-4,5</sub>, mientras que las medidas de conductividad de dispersiones de las proteínas en agua bidestilada arrojaron valores equivalentes en ambas muestras. Estos resultados indican que la cantidad de sales libres son comparables entre ambas proteínas y que las sales unidas son las que contribuyen al corrimiento en las T<sub>p</sub> observadas y por ende el catión calcio estaría ligado.

## Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas

**Tabla 21:** Datos correspondientes a termogramas de dispersiones acuosas proteicas (30% p/p; 5°C/min.). PST<sub>ac-5,5</sub>: Proteína de suero de tofu. El significado de los subíndices es el de la Figura 16. n.d.: No determinado.

Muestras de PPS	Comportamiento térmico			
	Tp I (°C)	Tp II (°C)	ΔH (J/g)	Relación de áreas I/I+II (%)
PSS <sub>ac-4,5</sub>	74,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	88,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,6 <sup>a</sup>	~50
PST <sub>ac-5,5</sub>	76,9 ± 0,2 <sup>b</sup>	94,5 ± 0,3 <sup>b</sup>	< 0,1 <sup>b</sup>	n.d.

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes (p<0,05).

El termograma obtenido para PST<sub>ac-5,5</sub> sin picos (Figura 16) es consistente con los numerosos tratamientos térmicos aplicados a estas proteínas mientras forman parte del ST durante la producción del tofu. Los resultados indican que estos tratamientos térmicos provocan una desnaturalización total del ITK y L y dejan activo al factor ITBB (transición a 138,5°C).

En 3.3.2 se vio que la AAR% de PSS<sub>ac-4,5</sub> es 90,1 mientras que para PST<sub>ac-5,5</sub> disminuyó hasta 7,2% indicando que la desnaturalización sigue la misma tendencia que la pérdida de actividad. La presencia del ITK e ITBB nativos en PSS<sub>ac-4,5</sub> son los responsables de la mayor AAR% en PSS<sub>ac-4,5</sub> mientras que el ITBB no desnaturalizado en PST<sub>ac-5,5</sub> justifica la actividad antitriptica remanente hallada.

### 4.3 Comportamiento térmico de mezclas ASN/PSS

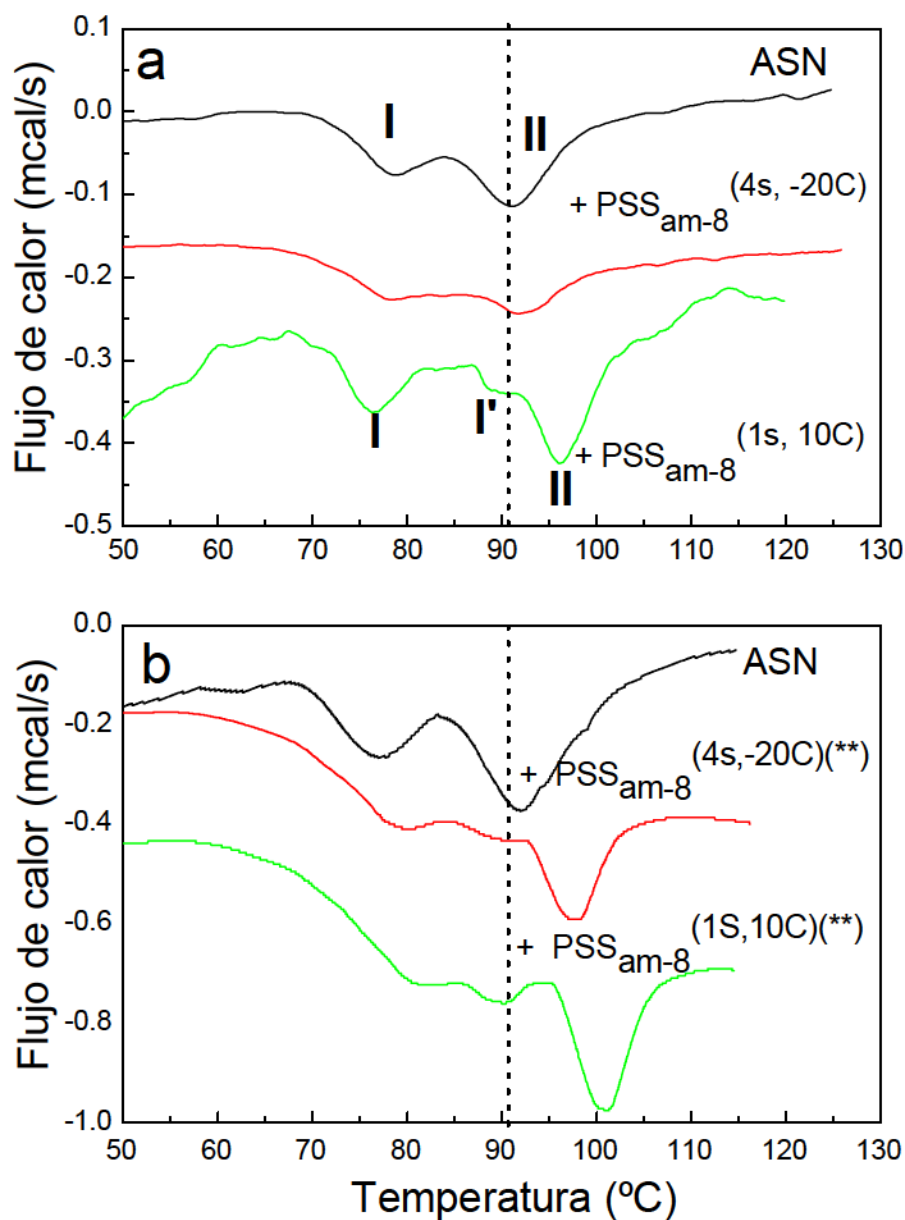
#### 4.3.1 Con PSS no tratada térmicamente

En esta sección se analizará el comportamiento térmico obtenido al mezclar ASN con diversas PSS a fin de analizar las interacciones entre estas muestras. Las mezclas fueron realizadas como se detalló en 2.9.1.

Las propiedades térmicas del ASN analizado y usado para preparar las mezclas fueron dadas en 4.2.1 (TpI: 77,5 ± 0,5; TpII: 91,0 ± 0,4°C con ΔH<sub>total</sub>: 17,1 ± 0,8 J/g). Para mejorar la apreciación de los cambios en las Tp de las mezclas en la Figura 21a se incluye una línea de puntos que indica la TpII del ASN solo.



## Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas



**Figura 21:** Termogramas de dispersiones acuosas (30% p/p, 5°C/min.) de ASN solo o mezclado con diferentes proteínas de suero. El termograma de ASN solo (en negro) se ubica en la parte superior en ambos termogramas. Junto a cada termograma se indica la proteína de suero con la que fue mezclada. a) Mezclas de ASN con (+) PSS<sub>am-8</sub><sup>(4s, -20C)</sup> o PSS<sub>am-8</sub><sup>(1s, 10C)</sup>. b) Mezclas de ASN con (+) PSS<sub>am-8</sub><sup>(4s, -20C)(\*\*)</sup> o PSS<sub>am-8</sub><sup>(1s, 10C)(\*\*)</sup>. La nomenclatura de las muestras fue dada en Tabla 17 y Figura 16. (\*\*): Indica que las proteínas fueron almacenadas en frascos tapados durante 9 años.

El termograma correspondiente a la mezcla de ASN con PSS<sub>am-8</sub><sup>(4s, -20C)</sup> presenta un corrimiento en la T<sub>p</sub>II de 0,6°C respecto del ASN solo, mientras que en la mezcla ASN/PSS<sub>am-8</sub><sup>(1s, 10C)</sup> el corrimiento es aún mayor (4,7°C) apareciendo una transición adicional denominada I'. Estos incrementos en las T<sub>p</sub> también fueron vistos al mezclar PSS<sub>am-8</sub><sup>(4s, -20C)</sup> o

## *Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas*

PSS<sub>am-8</sub><sup>(1s, 10C)</sup> con fracciones enriquecidas de glicinina o β-conglicinina de forma separada (Sobral y col., 2010).

Una tendencia similar pero con corrimientos de mayor magnitud es hallada en las mezclas ASN con PSS<sub>am-8</sub><sup>(4s, -20C)</sup> almacenado durante 9 años o ASN con PSS<sub>am-8</sub><sup>(1s, 10C)</sup> almacenado durante 9 años (Figura 21b). Resulta notable que los termogramas de estas 4 PSS (PSS<sub>am-8</sub><sup>(4s, -20C)</sup>, PSS<sub>am-8</sub><sup>(1s, 10C)</sup> recién obtenidas o luego de ser almacenadas durante 9 años) analizadas en forma aislada tengan Tp (I y II) prácticamente idénticas que se ubican entre 75,4-78,0 y 91,5-92,3°C para las transiciones I y II respectivamente (Tabla 19). Sin embargo, los termogramas de las mezclas son complejos y presentan al menos tres transiciones importantes denominadas I, I' y II respectivamente (Figura 21a).

En la Tabla 14 se vio que los termogramas de ASN y PSS analizadas en forma separada poseen transiciones con Tp coincidentes. Al analizar las mezclas asumiremos que el pico I se genera por superposición de las dos muestras, el pico II corresponde a la desnaturalización de la 11S que se corre por la presencia de las PSS, en tanto que el pico I' correspondería a la desnaturalización de la L en la que su comportamiento térmico se halla menos afectado por las condiciones externas respecto al comportamiento observado para la globulina 11S. La Tabla 22 resume los resultados obtenidos en estos ensayos de mezclas ASN/PSS.

En la Tabla 22 se observa que el incremento en la TpII ( $\Delta Tp$  II) de las mezclas ASN/PSS<sub>am-8</sub> o ASN/PSS<sub>am-8</sub><sup>(4s, -20C)</sup> es menor a 1°C teniendo ambas PSS un bajo grado de desnaturalización (Tabla 17). Mientras que las mezclas realizadas con PSS con un grado mayor de desnaturalización (PSS<sub>am-8</sub><sup>(1s, 10C)</sup> o PSS<sub>am-8</sub><sup>(4s, 10C)</sup>) dan incrementos en la TpII de 4-5°C. Estos resultados indican que hay un mayor aumento en la TpII en la medida que crece el grado de desnaturalización de la PSS usada en la mezcla. Cuando las mezclas son preparadas empleando PSS<sub>am-8</sub><sup>(4s, -20C)</sup> o PSS<sub>am-8</sub><sup>(1s, 10C)</sup> almacenadas las cuales presentan un mayor grado de desnaturalización (debido al almacenamiento), el incremento en la Tp es aún mayor (de 2 a 9 veces superior) al obtenido usando muestras frescas. La mezcla de ASN con PSS<sub>ac-4,5</sub>, el cual tiene Tp (I y II) significativamente menores que los de PSS<sub>am-8</sub> (Tabla 16), da un aumento en la TpII de 5,1°C.

## *Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas*

**Tabla 22:** Datos correspondientes a termogramas de dispersiones acuosas de mezclas proteicas (ASN/PSS, relación 1: 1% p/p) al 30% p/p a 5°C/min. Los valores de Tp y ΔH de las proteínas aisladas fueron dados en la Tabla 17 y en la sección 4.2.1 para ASN. ΔTp fue calculado como Tp<sub>mezcla</sub> – Tp<sub>ASN</sub>.

Mezclas		ΔH (J/g)	Tp I (°C)	Tp I' (°C)	Tp II (°C)	ΔTp I	ΔTp II
<b>ASN +</b>	PSS <sub>am-8</sub>	12,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	78,4 ± 0,6 <sup>a,b</sup>	----	91,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,2	0,1
	PSS <sub>am-8</sub> <sup>(4s, -20C)</sup>	12,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	77,0 ± 0,8 <sup>a</sup>	----	92,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	-1,2	0,6
	PSS <sub>am-8</sub> <sup>(1s, 10C)</sup>	11,5 ± 0,2 <sup>b</sup>	77,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	90-91	95,7 ± 0,4 <sup>b</sup>	-0,8	4,7
	PSS <sub>am-8</sub> <sup>(4s, 10C)</sup>	n.d.	77,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	91-92	95,0 ± 0,8 <sup>b</sup>	-1,0	4,0
	PSS <sub>am-8</sub> <sup>(4s, -20C)(**)</sup>	11,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	78,8 ± 0,6 <sup>b</sup>	89,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	97,6 ± 0,7 <sup>c</sup>	1,2	5,2
	PSS <sub>am-8</sub> <sup>(1s, 10C)(**)</sup>	11,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	80,4 ± 1,4 <sup>a,b</sup>	90,3 ± 0,8 <sup>a</sup>	100,6 ± 0,4 <sup>d</sup>	2,8	8,2
	PSS <sub>ac-8</sub> <sup>(H8)</sup>	9,3 ± 0,3 <sup>c</sup>	88,9 ± 0,6 <sup>c</sup>	93,4 ± 0,8 <sup>b,c</sup>	101,6 ± 0,6 <sup>d,e</sup>	11,3	9,2
	PSS <sub>ac-4,5</sub>	12,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	78,6 ± 0,1 <sup>a,b</sup>	92,6 ± 0,3 <sup>b</sup>	97,5 ± 0,3 <sup>c</sup>	0,8	5,1
	PST <sub>ac-5,5</sub>	13,8 ± 0,1 <sup>d</sup>	83,3 ± 1,0 <sup>c</sup>	94,8 ± 0,7 <sup>c</sup>	102,4 ± 1,1 <sup>e</sup>	5,7	10,0

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes (p<0,05).

Llamativamente cuando las mezclas son realizadas con PSS<sub>ac-8</sub><sup>(H8)</sup> o PST<sub>ac-5,5</sub>, ambas proteínas con bajos valores de ΔH, se obtiene no solo un notable incremento en la Tp de la 11S (ΔTp II = 9-10°C) sino además un notable incremento de la TpI. En estos ensayos, los valores de ΔH no mostraron correlación con las características de las muestras y las entalpías en las mezclas resultan comparables a las obtenidas a partir del cálculo teórico basado en las entalpías de las muestras individuales analizadas por separado y el contenido de cada proteína en las mezclas. Evidentemente los ensayos de DSC de mezclas ASN/PSS demuestran que hay un incremento en la TpII consistente con la presencia de interacciones entre los componentes de las muestras de proteínas (ASN y PSS) lo que genera el incremento en la estabilidad térmica hallada. Este comportamiento térmico puede atribuirse a diferentes causas tales como: i) la fuerza iónica o la presencia de minerales tales como el calcio, los cuales pueden tener una influencia en el comportamiento térmico de las proteínas; ii) posibles interacciones que pueden establecerse entre las fracciones proteicas presentes entre ASN y las PSS cuando las mismas son mezcladas. Adicionalmente las proteínas de suero pueden estar en forma nativa, desnaturalizada o agregada.

## ***Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas***

A fin de poder dilucidar si los incrementos en las  $T_p$  de ASN pueden explicarse por las sales aportadas por las PSS en las respectivas mezclas, recurrimos a resultados previos obtenidos por otros autores (Iwabuchi y Yamauchi, 1987 y Petruccelli y Añón, 1996) quienes evaluaron la influencia del contenido de NaCl y calcio sobre las temperaturas de desnaturalización de la glicinina.

A partir de las medidas de CE y los contenidos de calcio de las PSS (Tabla 18) y de ASN (Tabla 9; sección 3.2) analizadas por separado se calculó el contenido total de sales y de calcio para el caso de las mezclas ASN/PSS (expresadas como g NaCl/g de muestra o mg Ca/g de muestra respectivamente).

De acuerdo a esto, solo las mezclas entre ASN con PSS<sub>ac-8</sub><sup>(H2)</sup>, PSS<sub>ac-4,5</sub> o PST<sub>ac-5,5</sub> exhiben niveles relativamente altos de NaCl y calcio (de al menos 0,05 g/g y 2 mg/g respectivamente). Sin embargo aún en estas muestras con alto contenido mineral, los valores son insuficientes para explicar los incrementos en las  $T_p$  observados ( $> 5^\circ\text{C}$ ) para el pico II (Tabla 22)

Estos resultados indican claramente que el incremento en la  $T_{pII}$  hacia temperaturas más elevadas en las mezclas no puede ser explicado por un incremento en la fuerza iónica o el contenido de calcio. Más aún, en muestras con bajo contenido salino (aisladas por *salting out* y posterior diálisis), se observa una desnaturalización parcial de las PSS sin cambios apreciables en sus  $T_p$  (del ITK y L) tras un almacenamiento prolongado (Tabla 17). Y cuando estas muestras fueron mezcladas con ASN se obtiene una fuerte influencia en la estabilidad térmica de las proteínas (Tabla 22).

Los termogramas de estas mezclas son más complejos que los correspondientes a las muestras por separados (Figura 21). Como se postuló previamente las transiciones endotérmicas I, I' y II corresponderían a la desnaturalización de las fracciones 7S-ITK, L y 11S respectivamente. Sin embargo los resultados mostrados hasta el momento no permiten determinar fehacientemente que transiciones corresponden a proteínas de ASN y cuales a PSS.

### **4.3.2 Con PSS tratada térmicamente**

Para poder dilucidar estas cuestiones y permitir un mejor entendimiento del comportamiento térmico de las mezclas ASN/PSS, se realizaron dos series de ensayos tendientes a esclarecer estas cuestiones. Por un lado se analizan por DSC mezclas de ASN con muestras de PSS



## *Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas*

desnaturalizadas. Por otra parte muestras de ASN son mezcladas con cantidades equivalentes de minerales (cenizas) provenientes de la calcinación hasta cenizas blancas de las diferentes PSS ensayadas. Para estos ensayos se utilizan proteínas de suero representativas de los comportamientos de interés tales como PSS<sub>ac-4,5</sub> (obtenida de harina fresca), PSS<sub>ac-8</sub><sup>(H8)</sup> (obtenida de harina almacenada durante 8 años) y PST<sub>ac-5,5</sub> las proteínas del suero de tofu. Los resultados se muestran en la Tabla 23. Cuando se analizan los termogramas de estas mezclas hay que tener presente que ya sea que se este mezclando ASN con PSS totalmente desnaturalizado o con las cenizas de PSS en cantidades equivalentes, las transiciones observadas en los termogramas se deben exclusivamente a la desnaturalización de las globulinas 7S y 11S del aislado.

**Tabla 23:** Temperaturas de pico (Tp) correspondientes a termogramas de dispersiones acuosas de mezclas de ASN/PSS, ASN/PSS<sup>Des</sup> o ASN/cenizas de PSS al 30% p/p a 5°C/min. <sup>Des</sup>: Desnaturalizada. Mezcla control: ASN con PSS no tratada térmicamente. Las Tp de las PSS se encuentran en las Tablas 17 y 19. ΔTp (respecto de ASN) fueron calculados como  $Tp_{mezcla} - Tp_{ASN}$ ; ΔTp (respecto a mezclas ASN/PSS) fue calculado como  $Tp_{mezcla} - Tp_{mezcla\ control}$ .

Mezclas		Tp I (°C)	ΔTp I (°C)		Tp II (°C)	ΔTp II (°C)	
			respecto a ASN	respecto a mezclas ASN/PSS		respecto a ASN	respecto a mezclas ASN/PSS
ASN +	PSS <sub>ac-4,5</sub>	78,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,8	----	97,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,1	----
	PSS <sub>ac-4,5</sub> <sup>Des</sup>	83,5 ± 0,2 <sup>b</sup>	5,9	4,9	102,3 ± 0,1 <sup>b</sup>	9,9	4,8
	Cenizas de PSS <sub>ac-4,5</sub>	77,2 ± 0,8 <sup>c</sup>	-0,4	-1,4	92,9 ± 0,3 <sup>c</sup>	0,5	-4,6
ASN +	PSS <sub>ac-8</sub> <sup>(H8)</sup>	88,9 ± 0,6 <sup>d</sup>	11,3	----	101,6 ± 0,6 <sup>b</sup>	9,2	----
	PSS <sub>ac-8</sub> <sup>(H8)Des</sup>	86,7 ± 1,2 <sup>d</sup>	9,1	-2,2	104,7 ± 0,5 <sup>d</sup>	12,3	3,1
	Cenizas de PSS <sub>ac-8</sub> <sup>(H8)</sup>	78,1 ± 0,7 <sup>a,c</sup>	0,5	-10,8	92,5 ± 0,3 <sup>c</sup>	0,1	-9,1
ASN +	PST <sub>ac-5,5</sub>	83,3 ± 1,0 <sup>b,e</sup>	5,7	----	102,4 ± 1,1 <sup>b</sup>	10,0	----
	PST <sub>ac-5,5</sub> <sup>Des</sup>	81,0 ± 1,3 <sup>e</sup>	3,4	-2,3	100,8 ± 1,1 <sup>b</sup>	8,4	-1,6
	Cenizas de PST <sub>ac-5,5</sub>	99,7 ± 2,4 <sup>f</sup>	22,1	16,4	124,5 ± 1,2 <sup>e</sup>	32,1	22,1

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes (p<0,05).

## *Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas*

Los datos de la Tabla 23 muestran que PSS<sub>ac-4,5</sub> desnaturalizada induce un gran incremento en las Tp de I y II con respecto a los incrementos producidos por las muestras no calentadas. Este resultado está de acuerdo con la alta tendencia que exhiben el ITK y la L desnaturalizada a interaccionar y estabilizar las globulinas 7S y 11S, lo que se correlaciona con los notables incrementos en la hidrofobicidad superficial, que fueron hallados y reportados en trabajos previos (Mitidieri y Wagner, 2002).

Como se detalló en la Tabla 6 PSS<sub>ac-8</sub><sup>(H8)</sup> fue obtenida mediante precipitación con acetona a partir de harina almacenada durante 8 años, lo que favorece las reacciones de agregación proteica. Cuando PSS<sub>ac-8</sub><sup>(H8)</sup> fue tratada térmicamente se formaron agregados-desnaturalizados que son más reactivos, lo que incrementa el corrimiento del pico I y del pico II hacia valores mayores de temperatura. Las mezclas de ASN/PST<sub>ac-5,5</sub> muestran un comportamiento similar respecto a las Tp para las transiciones I y II independientemente del tratamiento térmico ( $p < 0,05$ ). Este comportamiento se explica con base en las particulares características de PST<sub>ac-5,5</sub> obtenida a partir del ST que ha sufrido varios tratamientos térmicos y en donde las proteínas están constituidas principalmente por ITK y L totalmente desnaturalizada.

Se obtiene un resultado interesante cuando se mezcla ASN con las cenizas obtenidas a partir de la calcinación de las muestras de PSS. Con respecto al efecto del agregado de ceniza de PSS<sub>ac-4,5</sub> o PSS<sub>ac-8</sub><sup>(H8)</sup> obtenida a partir de una harina fresca o almacenada respectivamente, se ve claramente que los minerales de las PSS son incapaces de producir los aumentos en las Tp observadas en las mezclas ASN/PSS (Tabla 23). Estos resultados indican que los minerales presentes en las PSS<sub>ac-4,5</sub> o PSS<sub>ac-8</sub><sup>(H8)</sup> no tienen un efecto significativo en la estabilidad térmica de fracción 11S.

Un resultado diferente se obtuvo cuando se analiza la mezcla ASN/PST<sub>ac-5,5</sub>. De acuerdo a los datos de la Tabla 9 el contenido de minerales y calcio fueron significativamente mayores que los hallados en otras PSS. Debe tenerse en cuenta que luego del proceso de calcinación, el calcio se encuentra en estado libre y por lo tanto es altamente reactivo con las globulinas 7S y 11S. Este hecho indicó, como ya se viene mencionando, que el calcio está fuertemente unido en las PST<sub>ac-5,5</sub> ya que se obtiene un marcado incremento cuando el calcio es liberado de estas proteínas mediante calcinación, cosa que se aprecia en los valores de las TpI y II de los termogramas de mezclas ASN/PST<sub>ac-5,5</sub>. Finalmente podemos remarcar que tanto el ITK como la L desnaturalizada poseen una alta tendencia a interaccionar con la globulina 11S.

## ***Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas***

En estudios recientes (Ren y col., 2009) analizaron la co-precipitación de globulinas de reserva y proteínas de suero a pH 4,5 luego de tratar térmicamente leche de soja. De acuerdo a estos resultados, no es posible descartar la influencia de otros componentes minoritarios en la estabilidad térmica de las mezclas de proteínas ASN/PSS, por lo que se requerirían estudios adicionales para dilucidar en profundidad los mecanismos e interacciones involucrados al realizar estas mezclas.

### **4.4 DSC de proteínas de suero de soja con diferentes contenidos de humedad**

Para el estudio del comportamiento térmico con diferentes contenidos de humedad se utiliza la muestra PSS<sub>ac-4,5</sub>, por ser de fácil obtención (sin ajustes de pH y precipitada directamente con acetona, sin etapa de diálisis) y con un bajo nivel de desnaturalización (sección 4.2.2.1).

Los resultados de termogramas de PSS<sub>ac-4,5</sub> con diferentes contenidos de humedad (0-73,0% p/p) se muestran en la Figura 22.

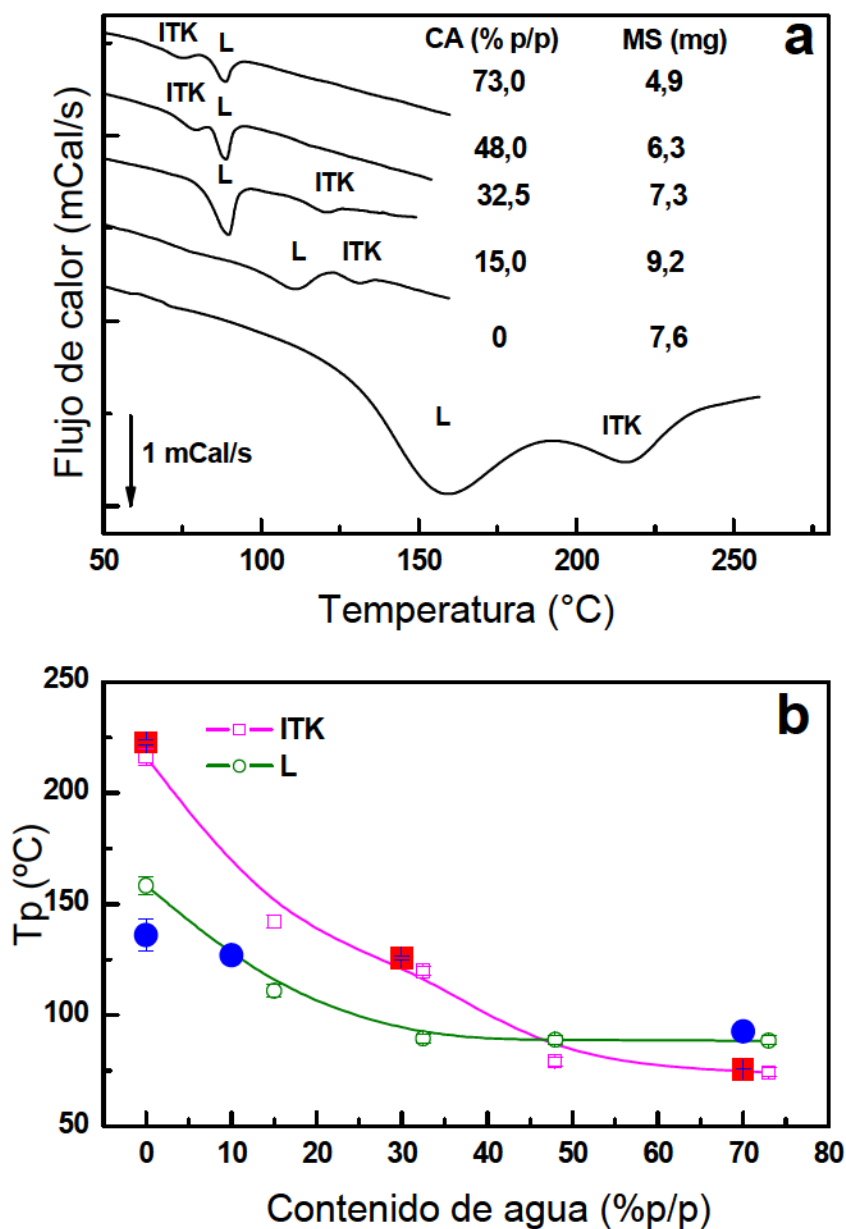
En 4.2.2.1 se vio que el termograma de PSS<sub>ac-4,5</sub> con un contenido de agua del 50% p/p presentó un aumento en la entalpía de desnaturalización y en las Tp de ambas transiciones respecto al termograma con un contenido de agua del 70%. Cuando PSS<sub>ac-4,5</sub> fue analizada empleando un contenido de agua del 50% p/p, la Tp I correspondiente al ITK fue significativamente mayor que la Tp I hallada empleando un 70% de agua. La reducción en el contenido de humedad del 70 al 50% p/p aumentó la Tp I en 1,8°C. Este resultado mostró que tanto en el SSL (Figura 15) o en las proteínas aisladas, ITK resulta ser la fracción proteica que más modifica su Tp con el contenido de agua.

Este resultado hallado con PSS<sub>ac-4,5</sub> está de acuerdo con el comportamiento térmico del ITK hallado en SSL, donde la Tp correspondiente a este factor antitriptico fue la que experimentó una mayor variación con el contenido de humedad (Figura 15).

En la Figura 22a se observa que con un contenido de agua (CA) del 73% p/p las transiciones correspondientes a la desnaturalización del ITK y L tienen Tp de  $74,4 \pm 0,3$  y  $88,5 \pm 0,2$ °C respectivamente (Tabla 16). Estas Tp son coincidentes con los resultados mostrados en la Tabla 14 los cuales corresponden a proteínas de suero preparadas por *salting out*. La concordancia entre las Tp de ambos tipos de proteínas cuando el agua esta en exceso sugiere

## Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas

que el comportamiento térmico de las proteínas no es afectado por los componentes no proteicos presentes en PSS<sub>ac-4,5</sub>.



**Figura 22:** a) Termogramas de PSS<sub>ac-4,5</sub> con diferentes contenidos de agua (CA) a 5°C/min. CA entre 15,0-73,0% p/p. MS: Masa seca. b) Efecto del contenido de agua (% p/p) sobre las T<sub>p</sub> (°C) del ITK en PSS<sub>ac-4,5</sub> (curva en magenta) y de la L en PSS<sub>ac-4,5</sub> (curva en verde). Se incluyen las T<sub>p</sub> de patrones comerciales del ITK (CA de cero y 30% p/p; cuadrados rojos) y patrones purificados de L (CA de cero y 10% p/p; círculos azules). Empleando los mismos símbolos de los patrones y para un CA del 70% se incluyeron las T<sub>p</sub> de las fracciones del ITK y L purificadas reportados por Sorgentini y Wagner (1999).



## *Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas*

Cuando el CA es 48,0% Tp de L casi no se modifica mientras que la Tp del ITK aumenta significativamente estando aún por debajo de L.

Por el contrario cuando CA es del 32,5%, L sigue sin cambios apreciables en la Tp, mientras que ITK aumenta notablemente su estabilidad teniendo ahora una mayor Tp que L, habiéndose producido la inversión térmica en la estabilidad de estas dos fracciones. Cuando el CA es menor se mantiene la tendencia pero se observa que L aumenta también su estabilidad. En condiciones anhidras (Figura 22a) los termogramas de PSS<sub>ac-4,5</sub> presentan dos amplias transiciones a 158,2 y 216,0°C correspondientes a L e ITK respectivamente.

Cuando se realizan ensayos de DSC modulados se encuentra un valor de Tg de  $128,0 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$  previo a la desnaturalización del ITK y la L. Este comportamiento está de acuerdo con los datos previamente informados para otras proteínas en condiciones anhidras (Roos, 1995).

Es generalmente aceptado que la estructura usualmente compacta de la proteína se despliega durante el proceso de desnaturalización. El proceso de desplegamiento es acompañado por la ruptura y reformación de interacciones intra e intermoleculares (Careri y col., 1979). Las moléculas de agua juegan un papel importante en la formación y rupturas de estas interacciones. Este efecto se refleja en un incremento en la temperatura de desnaturalización en la medida que disminuye el contenido de agua.

Una reducción en los niveles de agua puede conducir a una desestabilización del estado desplegado de forma relativa al estado nativo, esto es debido a que las especies cuando se encuentran en un estado desplegado tienen una mayor interfase con el solvente en comparación con el estado plegado. Por lo dicho una desestabilización del estado desplegado da como resultado un incremento en la temperatura de desnaturalización (Zhong y Sun, 2000).

A diferencia de lo observado con SSL, en que las Tp se mantenían constantes a bajos contenidos de humedad, con PSS<sub>ac-4,5</sub> analizada con diferentes contenidos de humedad se encuentra un incremento en las Tp (Figura 22b) tanto para el ITK como para la L a bajos contenidos de humedad.

Entre 0 y 30% p/p de contenido de agua la Tp del ITK fue siempre mayor que la de la L, la que alcanza un valor mínimo y constante a partir de un contenido de agua del 30% p/p. Sin embargo la Tp del ITK exhibe una tendencia decreciente en todo el rango de contenidos de humedad, dando como resultado una inversión en la estabilidad térmica cuando se alcanza un

## *Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas*

CA  $\approx$  50% p/p de agua. En este punto se produce un cruce de las curvas correspondientes al ITK y L que se observa en forma efectiva (Figura 22b).

Para contenidos de humedad superiores al 50% p/p el ITK es térmicamente menos estable que la L. Cuando se analizan los termogramas de patrones purificados del ITK y L se observa un comportamiento similar al hallado en PSS<sub>ac-4,5</sub>. En estos ensayos y para los patrones del ITK y L analizados en condiciones anhidras los picos mayoritarios se ubican a  $222,6 \pm 0,5$  y  $136,0 \pm 7,0^\circ\text{C}$ , respectivamente. Estas temperaturas decrecen en la medida que se incrementa el contenido de agua, demostrando la inversión térmica (Figura 22b).

Un estudio comparativo entre las Figuras 22b y 15b muestra que la inversión se observa para mayores contenidos de agua para PSS respecto de SSL, lo que puede ser explicado por la liberación de agua que sucede durante el calentamiento del SSL, lo cual es consecuencia del alto contenido de azúcar del suero.

Kitabatake y col. (1990) realizaron ensayos de DSC con fracciones 7S y 11S purificadas informando que la desnaturalización de ambas fracciones, cuando el contenido de humedad es bajo, se produce a 130 y 180°C respectivamente, exhibiendo un descenso en las temperaturas de desnaturalización cuando el contenido de humedad se incrementó.

**Tabla 24:** Entalpías de desnaturalización ( $\Delta H$ ) obtenidas a partir de termogramas de PSS<sub>ac-4,5</sub> con diferentes contenidos de agua. Los termogramas se muestran en la Figura 22a.

Contenido de agua (%)	Entalpía parcial (J/g proteína)		ITK: L Relación de áreas	$\Delta H$ total (J/g proteínas crudas)
	ITK	L		
0,0	$36,1 \pm 1,3^a$	$81,5 \pm 1,7^a$	1: 2,26	$216,8 \pm 3,0^a$
15,0	$1,4 \pm 0,3^b$	$8,9 \pm 1,0^b$	1: 6,39	$19,1 \pm 1,2^b$
32,5	$1,3 \pm 0,2^b$	$6,7 \pm 0,7^c$	1: 5,35	$14,8 \pm 0,8^c$
48,0	$2,7 \pm 0,2^c$	$4,4 \pm 0,3^d$	1: 1,62	$12,4 \pm 0,5^d$
73,0	$2,8 \pm 0,1^c$	$4,2 \pm 0,2^d$	1: 1,51	$13,3 \pm 0,3^e$

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Los trabajos realizados por Sessa (1992) mostraron que fracciones electroforéticamente puras de las fracciones 11S, 7S e ITK se desnaturalizan a  $210,2 \pm 0,2$ ;  $218,5 \pm 0,6$  y  $203,6 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , respectivamente cuando el contenido de humedad “aparente” fue cero. Sessa, halló además

## *Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas*

escasas variaciones en la entalpía de desnaturalización y que dichas temperaturas disminuyeron cuando el contenido de humedad aumentó.

En nuestros ensayos la humedad cero se aseguró mediante el uso de  $P_2O_5$  como agente deshidratante, lo que se refleja en una  $T_p$  que es aproximadamente  $20^\circ C$  mayor para el patrón ITK ( $222,6 \pm 0,5^\circ C$ ). Respecto al  $\Delta H_{desnat.}$  los termogramas de  $PSS_{ac-4,5}$  (que también se vio con SSL) revelaron que las entalpías involucradas en la desnaturalización del ITK son siempre menores comparadas con las de L (Tabla 24).

Resulta evidente que los  $\Delta H_{total}$  (tanto para ITK como para L) permanecen prácticamente constantes cuando el contenido de agua se mantiene en el rango entre 15,0-73,0%, pero se incrementan notablemente cuando  $PSS_{ac-4,5}$  esta por debajo del 15%. El  $\Delta H$  de  $PSS_{ac-4,5}$  en estado anhidro fue aproximadamente 16 veces más alto que el correspondiente valor medido con un 73,0% p/p de agua.

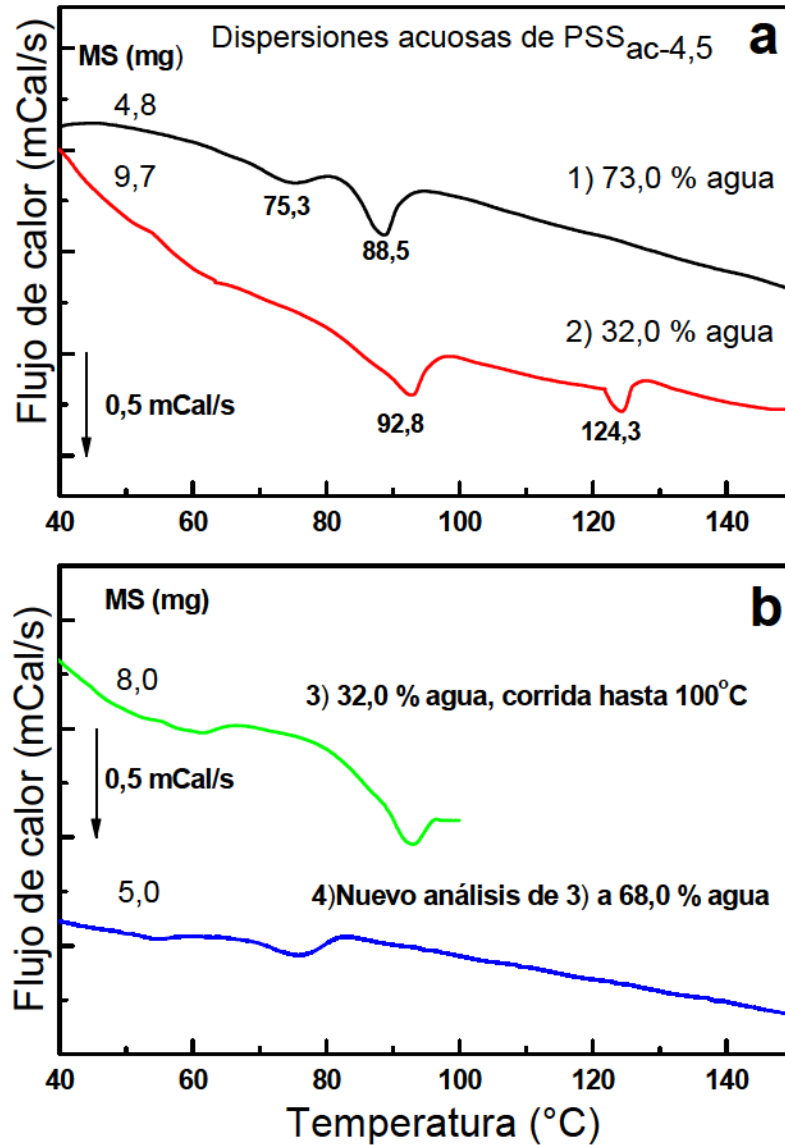
En condiciones anhidras, las entalpías halladas para las fracciones purificadas del ITK y L exhiben la misma tendencia respecto a las mismas fracciones proteicas en  $PSS_{ac-4,5}$  ( $27,2 \pm 2,2$  y  $90 \pm 15$  J/g, respectivamente). De acuerdo a Sessa (1992), el  $\Delta H$  permanece constante para el ITK en el rango de humedad ensayado (desde 70,0% p/p hasta un contenido “aparente” de agua de cero).

Como ya fuera mencionado cuando se alcanzan condiciones de deshidratación total mediante el empleo del  $P_2O_5$  como agente deshidratante, los valores de  $\Delta H$  para ITK y L hallados se incrementan notablemente dando un valor de entalpía total de  $216,8 \pm 3,0$  J/g proteína cruda. En ausencia de agua, las transiciones térmicas no solo involucran un proceso de desnaturalización sino reacciones de descomposición como las que fueron detalladas para el SSL.

Para confirmar la estabilización térmica del ITK en condiciones de baja humedad, se realizan ensayos adicionales empleando dos condiciones de humedad en los que el ITK se comporta en forma diferente (32,0 y 73,0% p/p agua) ya que en estas condiciones ITK y L exhiben una estabilidad térmica en la inversión (Figura 22a).

En un primer ensayo se realiza el ensayo DSC de  $PSS_{ac-4,5}$  al 32,0% p/p de agua hasta  $100^\circ C$ , condiciones en las cuales solo la L se desnaturaliza (Figura 23b). Recuperada y enfriada la muestra del primer ensayo, se la hidrata hasta alcanzar una humedad del 68,0% p/p y se corre nuevamente en las mismas condiciones en una cápsula nueva de DSC.

## Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas



**Figura 23:** a) Termogramas de dispersiones proteicas de PSS<sub>ac-4,5</sub> con diferentes contenidos de agua (CA) a 5°C/min. a) Dispersiones con CA de 73,0 y 32,0 (corridas 1 y 2 respectivamente). b) Termogramas de PSS<sub>ac-4,5</sub> con un CA del 32,0 (corrida 3), enfriada, llevada a un CA del 68,0% y vuelta a correr (corrida 4). Junto a cada termograma se indica la masa seca (MS) utilizada en cada ensayo.

En este nuevo ensayo la transición correspondiente a L no aparece en tanto que la correspondiente al ITK es hallada a 75°C, lo cual confirma que a bajos contenidos de agua esta proteína es más estable que la L.



### **4.5 Comportamiento térmico comparativo entre PSS<sub>ac-4,5</sub> y SSL**

El comportamiento térmico del ITK y L en PSS<sub>ac-4,5</sub> y SSL exhiben algunas diferencias importantes que merecen atención (Figuras 15a y 22a). En condiciones anhidras los termogramas de SSL exhiben  $T_p$  que son menores para L e ITK ( $120,5 \pm 3,0^\circ\text{C}$  y  $142,3 \pm 2,7^\circ\text{C}$ , respectivamente) respecto a las temperaturas observadas para las mismas fracciones proteicas en PSS<sub>ac-4,5</sub> ( $158,2 \pm 2,6^\circ\text{C}$  y  $216,0 \pm 5,8^\circ\text{C}$ , respectivamente).

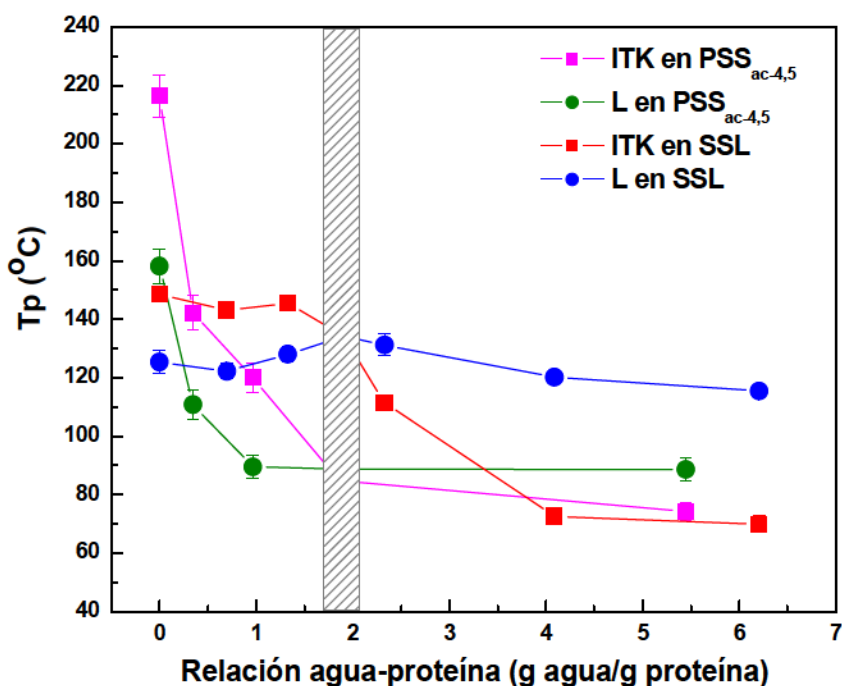
Por un lado los cambios en el comportamiento térmico resultan más evidentes para el ITK. Además la línea de base del termograma correspondiente al SSL experimentó una deriva ascendente hasta los  $170^\circ\text{C}$ . Este comportamiento no fue observado para PSS<sub>ac-4,5</sub>, y se atribuyó a una reacción exotérmica de glicosilación (Sobral y Wagner, 2007a). Se asumió que esta reacción fue favorecida por la alta relación (3: 1) en el contenido de carbohidratos y proteína en el SSL. En contrapartida los termogramas de PSS<sub>ac-4,5</sub> no presentaron esta deriva ascendente, lo que puede indicar la baja contribución a la transición exotérmica atribuible a la glicosilación de las proteínas (Figura 22a).

Otra diferencia entre el comportamiento térmico hallado entre PSS<sub>ac-4,5</sub> y el SSL fue el diferente contenido de agua en el que la inversión en la estabilidad térmica fue observada. Para el SSL la inversión ocurrió entre el 15,0-17,0% de humedad (según la rampa de calentamiento considerada) mientras que para PSS<sub>ac-4,5</sub> el cruce de las curvas se produjo en las proximidades del 50,0% de humedad (Figuras 15b y 22b).

Sin embargo cuando dichas  $T_p$  se grafican en función de la relación de masas entre agua y proteína (A/P), expresado como g de agua/g de proteína, la inversión es observada a la misma relación A/P ( $1,9 \pm 0,1$ ; Figura 24). La zona de  $A/P < 1,9$  g agua/g proteína exhibe las mayores diferencias entre el SSL y PSS<sub>ac-4,5</sub> respecto al efecto que el contenido de agua ejerce sobre el comportamiento térmico. Para PSS<sub>ac-4,5</sub> las  $T_p$  tienen una macada dependencia en la relación A/P (especialmente para una relación A/P menor a 1,0 g agua/g proteína). Por otra parte el efecto del contenido de agua no es tan evidente para el SSL. Para valores de A/P menores a 1,0 g de agua/g de proteína, las moléculas de agua podrían interaccionar fuertemente con las moléculas de proteína en el caso de PSS<sub>ac-4,5</sub>, y cuando la reacción se aproxima a 0 g de agua/g de proteína estarían más fuertemente ligadas. Por lo tanto la estabilidad térmica de las proteínas se incrementaría notablemente.

## Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas

En un estudio de la estabilidad térmica de la lisozima a bajos contenidos de humedad se postuló que por debajo de 0,3 g agua/g proteína las moléculas de agua están unidas por puentes de hidrógeno a los residuos polares de los aminoácidos en la superficie de las proteínas (Fujita y Noda, 1978). En un estudio más reciente Zhong y Sun (2000) evaluaron el comportamiento térmico de las globulinas de soja 7S y 11S y reportaron que por debajo de 0,30-0,32 g de agua/g proteína el agua se encuentra como agua no congelable.



**Figura 24:** Efecto de la relación agua-proteína (g agua/g de proteína) sobre las temperaturas de pico ( $T_p$ ) del ITK y L para el SSL y PSS<sub>ac-4,5</sub>. El área sombreada incluye los puntos de cruces de las curvas para ITK y L para ambas muestras. La concentración de proteína fue determinada por el método de Lowry. Los termogramas fueron realizados utilizando una rampa de calentamiento de 5°C/min. Se emplearon los mismos símbolos que en las Figuras 15b y 22b.

Para SSL las  $T_p$  para ITK y L son menores a 150°C y se mantienen relativamente constantes en el rango de A/P entre 0 y 1,5 g de agua/g de proteína. Más aún cuando  $A/P > 1$  g agua/g proteína un estudio comparativo entre los valores de las  $T_p$  para ITK y L en ambas muestras revela un incremento en la estabilidad térmica en las muestras de SSL (Figura 24).

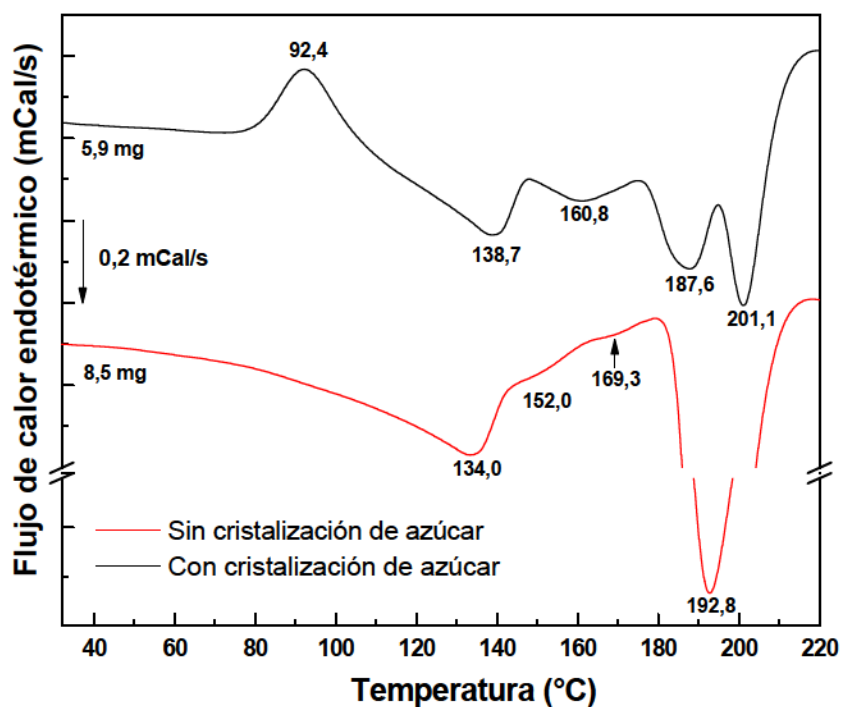
Una posible explicación para este comportamiento observado es que el alto contenido de azúcares tiende a incrementar el rango en el que las moléculas de agua se comportan como agua ligada. Los ensayos de DSC revelan que cuando la relación  $A/P \leq 1,3$  g de agua/g de

## Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas

proteína (contenido de agua 0-12,0%) no se detecta agua congelable (AC). Cuando la relación  $A/P = 1,9$  g de agua/g de proteína (17,0% de contenido de agua) se corresponde con la inversión térmica y se observa una cantidad incipiente de AC ( $< 0,3\%$ ). Finalmente, cuando la relación  $A/P$  se incrementa ( $> 1,9$  g de agua/g de proteína) el efecto del contenido de agua en la estabilidad térmica de las proteínas se observa de manera notable especialmente para ITK. La disminución en los valores de  $T_p$  se atribuye a la presencia de agua libre y a una disminución en la influencia que tienen los azúcares sobre el sistema.

Es posible realizar una comparación entre el comportamiento térmico del ITK y la L en el SSL y en  $PSS_{ac-4,5}$  y los datos reportados por Sessa (1992) para las globulinas 7S y la 11S en proteínas purificadas y en harina desgrasada.

Los resultados de Sessa (1992) mostraron que el comportamiento térmico de las fracciones purificadas 7S y 11S analizados a bajos contenidos de agua próximos a cero, indican que la desnaturalización térmica de ambas fracciones sucede a temperaturas superiores a los  $200^{\circ}C$ . Sin embargo cuando se realizó el estudio en harina desgrasada las  $T_p$  para las fracciones 11S y 7S fueron  $190$  y  $130^{\circ}C$ , respectivamente.



**Figura 25:** Mezclas  $PSS_{ac-4,5}$ -sacarosa analizadas por DSC modulado con y sin cristalización de azúcar. Rampa de calentamiento:  $5^{\circ}C/min$ .

## *Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas*

De esta forma debemos considerar que las harinas contienen oligosacáridos y otros componentes minoritarios que pueden afectar la estabilidad térmica de las proteínas en la harina. De manera similar para el SSL en condiciones anhidras la presencia de azúcares disminuye los valores en las  $T_p$  del ITK y L.

Con el fin de confirmar si los azúcares son realmente los responsables del comportamiento observado en las proteínas de suero en el SSL, se realizan ensayos mediante colorimetría diferencial de barrido de mezclas PSS<sub>ac-4,5</sub>-sacarosa en estado amorfo en condiciones anhidras. Se utiliza una relación en masa sacarosa: proteína de 3: 1 p/p que es similar a la relación hallada en el SSL.

Este estudio revela dos comportamientos térmicos diferentes dependiendo del estado cristalino del azúcar. En la Figura 25 se observa un pico exotérmico a 92,4°C para el caso en que se produce la formación de cristales de azúcares, mientras que para la mezcla PSS<sub>ac-4,5</sub>-sacarosa en la que no se produce cristalización se observa un comportamiento similar al visto para el SSL analizado en condiciones anhidras (Figuras 14 y 15a) en donde los picos a 134,0 y 152,0 se atribuyeron a la desnaturalización térmica de la L e ITK, respectivamente. Adicionalmente un pico pequeño ubicado a 169,3°C que correspondería a la desnaturalización de ITBB que también fue observado en SSL en condiciones anhidras (Figura 14).

A temperaturas superiores a 170-180°C se observa una gran transición endotérmica ( $T_p = 192,8^\circ\text{C}$ ) que es consecuencia de la descomposición térmica del sistema. Este resultado ya fue hallado y reportado en trabajos previos (Sobral y Wagner, 2007a; Sobral y col., 2011).

De esta forma y como fue visto para el SSL la línea de base del termograma correspondiente exhibe incremento desde 140 hasta 170-180°C que se atribuye a las reacciones simultáneas de glicosilación proteica y deshidratación de azúcares que preceden a la descomposición del sistema.

En los casos en que se produce la cristalización de azúcares en la mezcla, el termograma superior muestra las correspondientes endotermas de L e ITK a 138,7 y 160,8°C respectivamente (Figura 25). Sin embargo, el ascenso o deriva ascendente en la línea de base es menos evidente debido a la menor contribución del azúcar cristalizado en los procesos de glicosilación y deshidratación. Además de los picos mencionados se observa un pico a 187,6°C que correspondería a la fusión de los cristales de azúcares previos a la descomposición del sistema ( $T_p = 201,1^\circ\text{C}$ ).



## ***Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas***

De acuerdo a la Figura 22a, las temperaturas de desnaturalización de L e ITK en condiciones anhidras en PSS<sub>ac-4,5</sub> fueron de 158,2 y 216,0°C respectivamente. Por lo tanto la presencia de sacarosa es la responsable de la menor estabilidad térmica observada en las proteínas de suero. En condiciones anhidras, los azúcares pueden experimentar deshidratación, liberando agua hacia el medio ambiente, lo que explicaría porque ITK y L exhiben estabilidades térmicas comparativamente menores para las mezclas PSS<sub>ac-4,5</sub>-sacarosa y SSL.

Tampoco se puede descartar la posibilidad que otras sustancias producidas durante la deshidratación de los azúcares (tales como los furfurales) contribuyan a la desestabilización proteica. Para la mezcla PSS<sub>ac-4,5</sub>-sacarosa el alto contenido de sacarosa condujo a la disminución en 45°C aproximadamente en el valor de T<sub>g</sub>, siendo esta otra posible explicación para las bajas temperaturas de desnaturalización registradas para las proteínas de suero en este sistema.

### **4.6 Conclusiones parciales**

El comportamiento térmico del aislado nativo de soja y las proteínas de suero de soja puede ser modificado por factores, tales como el almacenamiento de la materia prima de partida (harina), los productos intermedios para su obtención (precipitados isoelectricos) así como los productos finales (proteínas aisladas).

Los procesos de desnaturalización y agregación de las proteínas aumentan la estabilidad térmica de las proteínas aisladas. El almacenamiento o la desnaturalización térmica de las proteínas de suero permiten que se formen especies (parcialmente desnaturalizadas y agregadas) las cuales son más reactivas con el aislado de soja, particularmente con la glicinina de la fracción 11S, no pudiendo descartarse que esta mayor reactividad hallada sea potenciada por la presencia de calcio.

El comportamiento térmico del factor antitriptico de Kunitz y la lectina resultan altamente dependientes del contenido de agua y la presencia de azúcares y por lo tanto es diferente cuando el calentamiento se lleva a cabo sobre las proteínas aisladas o sobre el suero entero.

Sin embargo se halló una inversión en la estabilidad térmica entre estas dos fracciones tanto en suero de soja liofilizado como en proteínas aisladas a un mismo contenido de humedad.

## ***Comportamiento térmico de sueros y proteínas aisladas***

El inhibidor de la tripsina resulta más termoestable que la lectina en condiciones anhidras o de baja humedad, ocurriendo lo contrario cuando el contenido de humedad es medio-alto. La alta estabilidad del factor antitriptico en condiciones de baja humedad indica que los tratamientos térmicos fuertes aplicados sobre la soja y sus subproductos son siempre necesarios, a menos que se realice una hidratación antes del calentamiento.

Los azúcares ejercen una importante influencia en el comportamiento térmico de estas dos fracciones especialmente en condiciones de baja humedad o en condiciones anhidras en donde se ha observado una importante disminución en la estabilidad de ambas proteínas. La escasa variación en las temperaturas de pico hallada para ambas fracciones tanto en suero liofilizado como en proteínas aisladas se debe probablemente a una combinación en la disminución en la Tg del sistema, ausencia de agua libre y liberación de agua debido a reacciones de descomposición térmica.

El dramático descenso en la estabilidad térmica del factor antitriptico de Kunitz en la medida que se incrementa el contenido de agua sumando a la necesidad de convertir estos sueros en un producto de interés para la industria alimentaria que reduzca la contaminación del medio ambiente conduce a plantear una estrategia que contemple la deshidratación y posterior inactivación del factor antitriptico. Una estrategia sería obtener jarabes de suero con un 30% p/p de agua los cuales son microbiológicamente estables, no cristalizables y pueden ser inactivados a temperaturas relativamente bajas ( $< 100^{\circ}\text{C}$ ).

**5. Solubilidad, propiedades  
físicoquímicas y  
comportamiento superficial  
de proteínas aisladas**

## **5.1 Solubilidad en agua de proteínas en suero de soja y tofu líquidos y secados**

*Solubilidad de proteínas en sueros líquidos:* Las proteínas en los sueros originales de partida están totalmente solubles, sin embargo al secar estos sueros para obtener las muestras deshidratadas se observa una reducción de su solubilidad en agua destilada (S). La magnitud de la reducción en la S esta determinada por las características del suero de partida y por el secado utilizado para deshidratar los sueros.

*Solubilidad de proteínas en sueros secados:* La solubilidad de las proteínas en estos sueros fue calculada como el cociente entre la cantidad de proteína soluble respecto a la cantidad de proteína total. Los resultados de estas determinaciones se muestran en la Tabla 25.

**Tabla 25:** Solubilidad proteica en agua destilada en sueros deshidratados. Las abreviaturas de las muestras fueron datos en la Tabla 7.

<b>Muestra</b>	<b>Solubilidad</b>
SSL	84,5 ± 0,5 <sup>a</sup>
SSST	73,7 ± 0,4 <sup>b</sup>
STL	70,2 ± 0,3 <sup>c</sup>
STST	70,5 ± 0,4 <sup>c</sup>

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Las proteínas con la mayor S se encuentran en el SSL con una S significativamente menor respecto a las proteínas en el suero líquido de partida (100% solubles). Esta reducción en la S se debe a las reacciones de agregación inducidas durante el proceso de congelación previo a la liofilización. En orden decreciente de S hallamos a las proteínas presentes en el SSST, la S de las proteínas en este suero es 26,3% menor respecto al SS y significativamente menor que la hallada en el SSL ( $p < 0,05$ ; Tabla 25). Este resultado muestra que aún un secado a baja temperatura ( $T \leq 50^{\circ}\text{C}$ ) produce una reducción en la S proteica en  $\approx 10\%$  (referencia SSL). Esta reducción adicional en la S se debe a que el tratamiento térmico aplicado para el secado provoca un elevado grado de desnaturalización de las proteínas del suero, lo cual se vio claramente con el grado de inactivación del factor



## ***Solubilidad y propiedades fisicoquímicas***

antitriptico en la muestra SSST (Tabla 12). La solubilidad se ve por lo tanto reducida por la formación de agregados poco solubles a partir de las proteínas de suero desnaturalizadas. La diferencia de S de las proteínas entre los diferentes sueros de partida, puede analizarse comparando la S hallada de las proteínas en SSL respecto de STL. La S de las proteínas presentes en el STL es significativamente menor respecto de SSL ( $p < 0,05$ ; Tabla 25). Hemos visto que las proteínas en el ST están totalmente desnaturalizadas (sección 4.2.3), la menor S hallada indica además que estas proteínas desnaturalizadas se encuentran formando parte de agregados insolubles. Ambos procesos, desnaturalización-agregación, se producen durante los numerosos tratamientos térmicos aplicados en la producción del tofu y son favorecidos por la presencia de calcio. La agregación es exacerbada tanto por la liofilización como durante el proceso de secado térmico del ST, resultando en pérdidas en la solubilidad proteica del orden del 30% para ambos procesos, dando valores de S comparables para las proteínas presentes en STST y en el STL. Este resultado sugiere que, la metodología de secado del ST no afecta a la S de sus proteínas, debido a que las proteínas se encuentran en un avanzado estado de desnaturalización-agregación. Estos resultados sirven para decidir que el aislamiento de las proteínas sea realizado a partir de los sueros líquidos, de forma de obtener proteínas aisladas con la mayor solubilidad posible evitando la agregación adicional producida durante el secado de los sueros.

### **5.2 Solubilidad en agua de proteínas aisladas de sueros líquidos**

Los valores de solubilidad de las proteínas aisladas a partir de SS y ST se presentan en la Tabla 26. Entre las proteínas aisladas, la de mayor S y por lo tanto tomada como referencia es PSS<sub>am-8</sub>, con una S similar a la hallada en literatura. Mitidieri y Wagner (2002) informaron una S para PSS<sub>am-8</sub> > 99% realizando la determinación a una menor concentración (0,1% p/v) en donde la S de las proteínas es algo mayor.

La S de PSS<sub>am-8</sub> es significativamente mayor que la hallada en el SSL debido a que las proteínas se aíslan directamente del SS líquido evitando el proceso de secado que reduce la solubilidad proteica.

El valor de S para la muestra PSS<sub>am4,5</sub> es significativamente menor que para PSS<sub>am-8</sub> ( $p < 0,05$ ; Tabla 26), reducción debida a la mayor tendencia que tienen las proteínas desnaturalizadas a formar agregados. En 4.2.2.1 se halló una desnaturalización

## *Solubilidad y propiedades fisicoquímicas*

significativamente mayor para PSS<sub>am-4,5</sub> respecto a PSS<sub>am-8</sub> ( $P < 0,05$ ; Tabla 16). Los valores de entalpía halladas fueron 8,7 y 6,4 J/g proteína para PSS<sub>am-8</sub> y PSS<sub>am-4,5</sub> respectivamente con un predominio en la desnaturalización de L (sección 4.2.2.1). Los resultados en conjunto indican que las proteínas con un mayor grado de desnaturalización debido a la reducción de pH del SS tienen una mayor tendencia a formar agregados insolubles.

**Tabla 26:** Solubilidad en agua destilada al 1,0% p/v de proteínas de suero de soja (PSS) y proteínas de suero de tofu (PST). Los subíndices indican la metodología de aislamiento y el pH del suero de partida. ac: Precipitación con acetona. am: Precipitación con sulfato de amonio.

Muestra	Solubilidad
PSS <sub>am-8</sub>	97,0 ± 0,2 <sup>a</sup>
PSS <sub>am-4,5</sub>	85,1 ± 0,5 <sup>b</sup>
PSS <sub>ac-8</sub>	86,0 ± 0,4 <sup>b</sup>
PSS <sub>ac-4,5</sub>	85,0 ± 0,5 <sup>b</sup>
PST <sub>ac-5,5</sub>	79,9 ± 0,3 <sup>c</sup>

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Tanto a partir de SS ácido como alcalino las proteínas aisladas con acetona presentan valores de S comparables y significativamente menores respecto de PSS<sub>am-8</sub> ( $p < 0,05$ ; Tabla 26). Este comportamiento puede atribuirse a la formación de agregados proteicos lo cual es característico de esta metodología de aislamiento por insolubilización con solvente.

Cuando se analiza el efecto del pH de SS sobre la S se encuentra por *salting out* que la S de PSS<sub>am-4,5</sub> es significativamente menor comparada con PSS<sub>am-8</sub> indicando que a pH ácido se induce una mayor formación de agregados ( $p < 0,05$ ; Tabla 26).

Este resultado se comprende si se considera que, la solubilidad de una dada proteína depende de las interacciones polares que puede establecer con el solvente que la rodea, las interacciones iónicas con los solutos presentes y del balance entre las fuerzas atractivas y repulsivas entre las moléculas de proteína (Scopes, 1982). De esta forma, un ajuste del pH del suero hasta las proximidades del punto isoeléctrico permitirá reducir las repulsiones electroestáticas e incrementar las fuerzas atractivas entre las moléculas de proteína, principalmente por interacciones hidrofóbicas, aumentando la cantidad de agregados y reduciendo consecuentemente la solubilidad de las proteínas obtenidas.

Este comportamiento de la solubilidad con el pH del SS no es observado en las proteínas precipitadas con acetona, hallándose valores de S comparables para ambos pH. Esto puede

## *Solubilidad y propiedades fisicoquímicas*

atribuirse a que esta metodología de precipitación induce en sí misma una mayor formación de agregados que enmascara el efecto debido al pH ácido.

Finalmente en las PST<sub>ac-5,5</sub>, como es de esperar debido su elevado contenido de calcio y su grado de desnaturalización prácticamente total resulta ser la muestra con la menor solubilidad proteica ( $p < 0,05$ ; Tablas 9, 21 y 26).

### **5.3 Solubilidad en agua de proteínas en suero de soja liofilizado calentado**

Las solubilidades de las proteínas en el SSL no calentado o calentado en condiciones anhidras hasta distintas temperaturas finales se muestran en la Tabla 27. Las determinaciones de la S de las proteínas en los sueros de soja liofilizado calentado se realizó como se detalló en 2.7.5 precipitando a partir de dispersiones acuosas de los sueros deshidratados la proteína con TCA antes y después del proceso de centrifugación. Las proteínas aisladas fueron lavadas y cuantificadas, determinándose la solubilidad como el cociente entre la cantidad de proteína soluble respecto a la total.

Los datos de la Tabla 27 muestran que la S de las proteínas aumenta cuando el SSL es calentado entre 90-120°C mientras que tratamientos térmicos más enérgicos conducen a una marcada reducción en la S de las proteínas. La S de las proteínas en el SSLC (120) es significativamente mayor respecto de las del SSLC (90) y ambas poseen S significativamente mayores respecto las proteínas en el SSL.

Por el contrario las proteínas presentes en el SSLC (130) tienen una S significativamente menor a todas las mencionadas, observándose una reducción en la S con la temperatura entre 130 y 180°C. La S de proteínas en el SSLC (180) es 2,1 veces menor respecto de las proteínas del SSLC (120).

El aumento en la S hallado para las proteínas provenientes de SSL calentado a temperaturas relativamente bajas puede explicarse teniendo en cuenta que, en condiciones anhidras las proteínas no son fácilmente desnaturalizadas. En la sección 4.1, al analizar el termograma de SSL calentado en condiciones anhidras se vio que las proteínas no se desnaturalizan sino hasta alcanzar la zona 2 ( $100 < T < 170^\circ\text{C}$ ) produciéndose la desnaturalización de L e ITK en rango 120-130 y 140-150°C respectivamente. Pero además se vio que simultáneamente a la desnaturalización se inicia un proceso de glicosilación (visto como una exoterma a partir de  $\approx 110^\circ\text{C}$ , Figura 14).

## Solubilidad y propiedades fisicoquímicas

**Tabla 27:** Solubilidad en agua destilada al 1,0% p/v de proteínas en SSL y SSLC. Entre paréntesis se indica la temperatura de calentamiento del SSL.

Muestra	Solubilidad
SSL	84,5 ± 0,5 <sup>a</sup>
SSLC (90)	90,5 ± 0,9 <sup>b</sup>
SSLC (120)	97,0 ± 1,2 <sup>c</sup>
SSLC (130)	78,8 ± 1,0 <sup>d</sup>
SSLC (140)	64,0 ± 0,7 <sup>e</sup>
SSLC (150)	59,5 ± 0,6 <sup>f</sup>
SSLC (180)	46,1 ± 0,5 <sup>g</sup>

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

De esta forma en el SSLC (120) las proteínas estarían con un cierto grado de glicosilación y parcialmente desnaturalizadas, y en dicho estado las proteínas presentarían un mayor grado de desplegamiento y afinidad por el agua. Ensayos por SDS-PAGE de SSL y SSLC (90-120°C) mostraron un patrón electroforético equivalente compuesto por al menos 5 bandas importantes sin presencia de agregados en la parte superior del gel, pero detectaron la presencia de proteínas glicosiladas (subunidades de lectina y productos de Maillard) mediante coloración de PAS (Sobral y Wagner, 2007a).

La reducción en la S de las proteínas en SSL sometido a tratamientos térmicos más drásticos ( $T > 130^{\circ}\text{C}$ ) se debe a que, si bien sigue el proceso de glicosilación, en estas condiciones prevalece la formación de agregados proteicos insolubles. Las SDS-PAGE del SSLC ( $> 140^{\circ}\text{C}$ ) muestran un patrón electroforético simplificado compuesto por las bandas de L e ITK de menor intensidad con la aparición de agregados en la parte superior del gel (Sobral y Wagner, 2007a).

### 5.4 Solubilidad en agua de proteínas aisladas desde suero de soja liofilizado calentado

Los valores de S en agua destilada de proteínas precipitadas con acetona desde SSL y SSLC se muestran en la Tabla 28. La S en agua destilada de PSSL es significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que la hallada para PSS<sub>am-8</sub> (referencia; Tabla 26), con una reducción de  $\approx 33\%$  debido a una combinación entre la pérdida de solubilidad debido al proceso de deshidratación del SS y por la precipitación con acetona. Por otra parte, se observa también



## *Solubilidad y propiedades fisicoquímicas*

una reducción significativa en la S de PSSL respecto a las proteínas en el SSL (Tabla 27), lo cual se debe exclusivamente al efecto de agregación del solvente.

Cuando se compara la solubilidad de las proteínas aisladas con acetona a partir de PSSL con la correspondiente a las proteínas aisladas desde el SSL calentado en condiciones anhidras hasta diferentes temperaturas finales (PSSLC 90-180°C), se observa un aumento significativo en la S hasta 120°C seguido de una marcada reducción de S en la medida que aumenta la intensidad del tratamiento aplicado al SSL previo al aislamiento (Tabla 28).

**Tabla 28:** Solubilidad en agua destilada al 1,0% p/v de proteínas aisladas con acetona desde SSL (PSSL) y SSLC (PSSLC). Entre paréntesis se indica la temperatura de calentamiento del SSL.

Muestra	Solubilidad
PSSL	64,2 ± 0,5 <sup>a</sup>
PSSLC (90)	68,9 ± 0,5 <sup>b</sup>
PSSLC (120)	73,8 ± 0,5 <sup>c</sup>
PSSLC (130)	60,2 ± 0,5 <sup>d</sup>
PSSLC (140)	49,1 ± 0,5 <sup>e</sup>
PSSLC (150)	45,5 ± 0,5 <sup>f</sup>
PSSLC (180)	35,3 ± 0,5 <sup>g</sup>

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

La S de las PSSLC (90-120°C) es significativamente mayor respecto a PSSL ( $p < 0,05$ ; Tabla 28), siendo la S de PSSLC (120) la mayor entre todas las proteínas aisladas a partir de sueros liofilizados y calentados. Esta tendencia hallada para las proteínas aisladas con acetona es similar a la hallada en la sección anterior para las proteínas en SSL o SSLC.

El grado de desnaturalización (GD) de estas proteínas fue analizado en 4.2.2.4 hallándose para PSSLC (90) un GD del 7,7% debido a la desnaturalización del ITK (la lectina no se desnaturaliza a 90°C), mientras que en PSSLC (120) los GD para ITK y L fueron 17,3 y 21,2% respectivamente, confirmando la desnaturalización parcial de las proteínas en el SSLC (120).

Adicionalmente, el tratamiento térmico también aumentó el parámetro HC- $P_{TCA}$  utilizado para estimar el grado de glicosilación de las proteínas debido a las condiciones del tratamiento térmico. El parámetro HC- $P_{TCA}$  de las PSSLC (90) es significativamente mayor que el hallado para PSSL y aumenta con la intensidad del tratamiento térmico (sección 3.2.2). Matemu y col. (2009) demostraron que las proteínas glicosiladas tienen una mayor solubilidad respecto de las mismas proteínas no glicosiladas.

## *Solubilidad y propiedades fisicoquímicas*

Los resultados en conjunto sugieren que el aumento en la solubilidad de PSSLC (90-120°C) respecto de PSSL pueden atribuirse a una desnaturalización parcial combinada con un cierto grado de glicosilación proteica que posibilitarían una mayor interacción con el agua, mientras que la reducción en la solubilidad en las muestras PSSLC (>130°C) sería atribuible a un predominio del proceso de agregación de las proteínas con mayor grado de desnaturalización.

### **5.5 Solubilidad en agua de proteínas aisladas: Efecto del almacenamiento**

*Efecto del almacenamiento del suero isoeléctrico:* En esta sección se analizan los cambios en la S debido al almacenamiento del suero isoeléctrico en diferentes condiciones durante la preparación de PSS<sub>am-8</sub>, se incluye además para poder comparar la S de ASN.

La S hallada para el ASN es 98,0% (Tabla 29). Este valor es similar al informado por otros autores para aislados preparados en el laboratorio, caracterizados por su alta S y bajo grado de desnaturalización. Los valores de S informados para ASN fueron 98,3 y 99,8% (Sorgentini y col., 1995 y Wagner y col., 1996), más recientemente Palazolo y col. (2004) obtuvieron una S > 99% medida al 0,1% p/v en buffer fosfato 10 mM (pH = 7,0).

Entre las proteínas de suero, PSS<sub>am-8</sub> presentó una S elevada comparable a la de ASN (Tabla 29).

**Tabla 29:** Solubilidad en agua destilada al 1,0% p/v de proteínas aisladas. ASN: Aislado de soja nativo. Abreviaturas de la Tabla 26. Los superíndices indican la temperatura y tiempo de almacenamiento del suero isoeléctrico. <sup>s</sup>: Semanas.

Muestra	Solubilidad
ASN	98,0 ± 2,0 <sup>a</sup>
PSS <sub>am-8</sub>	97,0 ± 0,2 <sup>a</sup>
PSS <sub>am-8</sub> <sup>(4s, -20C)</sup>	90,4 ± 1,4 <sup>b</sup>
PSS <sub>am-8</sub> <sup>(1s, 10C)</sup>	89,1 ± 1,8 <sup>b</sup>
PSS <sub>am-8</sub> <sup>(4s, 10C)</sup>	88,8 ± 1,6 <sup>b</sup>

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes (p<0,05).

Cabe mencionar que, el extracto acuoso original obtenido a partir la harina a pH 8,0 contiene las proteínas solubles (proteínas de suero y globulinas de reserva) y que estas

## *Solubilidad y propiedades fisicoquímicas*

últimas son separadas bajando el pH a 4,5 y centrifugando en lo que se conoce como precipitación isoelectrica. En estas condiciones las proteínas de suero permanecen solubles. Durante este proceso el  $\text{pH} \approx \text{P}_i$  por lo que se reducen al mínimo las repulsiones electroestáticas y en estas condiciones se favorecen las interacciones proteína-proteína y la S alcanza un valor mínimo que permite la separación de las globulinas de reserva.

Dado que el  $\text{P}_i$  para las globulinas es  $\approx 4,5$  (Pearson, 1983), mientras que para ITK y L (principales constituyentes de las PSS), dicho valor se ubica en 4,5 y 5,8 respectivamente (Lotan y col., 1974; Pusztai y col., 1991), resulta interesante analizar porque las PSS no precipitan junto con las globulinas de almacenamiento.

Sorgentini y Wagner (2002) analizaron la solubilidad de ASN y  $\text{PSS}_{\text{am-8}}$  hallando que a  $\text{pH} > 7,0$  y  $\text{pH} < 2,0$  ambos tipos de proteínas tienen solubilidades elevadas, encontrando una drástica reducción en la S de ASN cuando el  $\text{pH} \approx 4,5$  sin cambios apreciables en la S para  $\text{PSS}_{\text{am-8}}$  en el rango de pH comprendido entre 4,5 y 10,0. Estos autores atribuyeron la mayor solubilidad de  $\text{PSS}_{\text{am-8}}$  a pH 4,5 al bajo PM y a su naturaleza hidrofílica. Por esta razón, se requiere del agregado de agentes precipitantes adicionales tales como la acetona o el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para inducir la precipitación de estas proteínas.

Además del pH hay otras variables, tales como modificaciones introducidas durante el aislamiento que pueden modificar la S de las proteínas.

En la Tabla 29 se muestra el efecto sobre la S de proteínas aisladas por *salting out* obtenidas luego de almacenar el precipitado isoelectrico en estado congelado o a temperatura de refrigeración. Por ejemplo, los valores de S de las proteínas obtenidas por *salting out* luego de almacenar el precipitado isoelectrico a  $-20^\circ\text{C}$  durante 4 semanas ( $\text{PSS}_{\text{am-8}}^{(4s, -20^\circ\text{C})}$ ) o durante 1 semana a  $10^\circ\text{C}$  ( $\text{PSS}_{\text{am-8}}^{(1s, 10^\circ\text{C})}$ ) resultan significativamente menores respecto de  $\text{PSS}_{\text{am-8}}$  ( $p < 0,05$ ; Tabla 29). La ausencia de diferencias significativas en el  $\Delta H_{\text{total}}$  entre estas proteínas (sección 4.2.2.2) indica que durante el almacenamiento del precipitado isoelectrico en estado congelado o refrigerado durante un corto tiempo no se produce desnaturalización pero si hay un aumento de las interacciones proteína-proteína con la consecuente formación de agregados insolubles.

Por el contrario, en las  $\text{PSS}_{\text{am-8}}^{(4s, 10^\circ\text{C})}$  el  $\Delta H_{\text{total}}$  es significativamente menor respecto de  $\text{PSS}_{\text{am-8}}^{(4s, -20^\circ\text{C})}$ ,  $\text{PSS}_{\text{am-8}}^{(1s, 10^\circ\text{C})}$  ( $p < 0,05$ ; Tabla 17), teniendo todas S comparables (Tabla 29).

Los resultados en conjunto permiten establecer que el almacenamiento de suero isoelectrico en estado congelado induce la formación de agregados de proteínas con un

## *Solubilidad y propiedades fisicoquímicas*

grado de desnaturalización comparable al de la fracción soluble, mientras que el almacenamiento del precipitado en condiciones de refrigeración produce desnaturalización y agregación.

*Efecto del almacenamiento de la harina:* Analizaremos ahora los cambios en la S en agua destilada de las proteínas aisladas con acetona a partir de harinas almacenadas. Los resultados de estas determinaciones se muestran en la Tabla 30 en donde se agregó la S de las proteínas aisladas en las mismas condiciones desde una harina fresca con fines comparativos.

El almacenamiento de la harina durante 2 años no produce cambios significativos en la S de las proteínas aisladas independientemente del pH del suero de partida (Tabla 30). Por el contrario, cuando el almacenamiento de la harina es más prolongado (8 años) se observa que la S de las proteínas depende del pH del suero. A partir de harina almacenada durante 8 años se obtiene proteína con una S comparable al de la proteína de harina fresca cuando el SS fue ajustado a pH 8,0 ( $p < 0,05$ ; Tabla 30).

**Tabla 30:** Solubilidad en agua destilada al 1,0% p/v de proteínas aisladas con acetona en frío. Los superíndices indican el tiempo de almacenamiento de la harina en años previo al aislamiento.

Muestra	Solubilidad
PSS <sub>ac-8</sub>	86,0 ± 0,5 <sup>a</sup>
PSS <sub>ac-8</sub> <sup>(H2)</sup>	85,5 ± 1,7 <sup>a</sup>
PSS <sub>ac-8</sub> <sup>(H8)</sup>	83,7 ± 1,9 <sup>a</sup>
PSS <sub>ac-4,5</sub>	85,0 ± 0,6 <sup>a</sup>
PSS <sub>ac-4,5</sub> <sup>(H2)</sup>	86,3 ± 1,3 <sup>a</sup>
PSS <sub>ac-4,5</sub> <sup>(H8)</sup>	80,3 ± 1,0 <sup>b</sup>

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Si se considera la escasa variación en la S de las proteínas durante el almacenamiento de la harina y el alto grado de desnaturalización registrado para las proteínas en la misma (sección 4.2.2.2) vemos que el almacenamiento de la harina induce en mayor grado la desnaturalización que la pérdida de S.

Solamente en las proteínas aisladas desde harina almacenada durante 8 años y realizando el aislamiento a partir de SS con un pH de 4,5 se observa una reducción significativa en la S respecto a la S de PSS<sub>ac-4,5</sub> ( $p < 0,05$ ; Tabla 30). En estas proteínas la reducción en la S



## *Solubilidad y propiedades fisicoquímicas*

puede atribuirse a la mayor tendencia que tienen las proteínas desnaturalizadas durante el almacenamiento a formar agregados debido a precipitación con acetona.

Es bien sabido que la precipitación con solvente induce la agregación proteica, adicionalmente si la precipitación se lleva a cabo en las proximidades del  $P_i$  donde las repulsiones electrostáticas son mínimas hay un incremento en las fuerzas atractivas que reducen la solubilidad de las proteínas obtenidas.

Un comportamiento similar fue hallado por Wagner y col. (1996) al analizar la S de un ASN obtenido a partir de una harina fresca y otro aislado de una harina almacenada durante un año. Estos autores hallaron una reducción  $\approx 9\%$  en la S del ASN de la harina almacenada (referencia ASN de harina fresca) indicando que el almacenamiento de la harina condujo a la obtención de proteínas conteniendo agregados proteicos en un estado incipiente de agregación que tienden a volverse parcialmente insolubles durante el proceso de aislamiento.

*Efecto del almacenamiento de las proteínas aisladas:* Finalmente analizaremos si hay cambios en la S cuando son almacenadas las muestras proteicas. En la Tabla 31 se muestran los valores de S hallados tras un almacenamiento prolongado en condiciones controladas (frascos tapados, 9 años a 4°C) de proteínas que representen las dos condiciones de almacenamiento del suero isoeléctrico: almacenamiento congelado y a temperaturas de refrigeración.

**Tabla 31:** Solubilidad en agua destilada al 1,0% p/v de proteínas aisladas. La nomenclatura de las muestras fue dada en la Tabla 29. (\*\*): Almacenamiento de las proteínas durante 9 años en frascos tapados a 4°C.

Muestra	Solubilidad
$PSS_{am-8}^{(4s, -20C)}$	$90,4 \pm 1,4^a$
$PSS_{am-8}^{(4s, -20C)(**)}$	$\sim 82^b$
$PSS_{am-8}^{(1s, 10C)}$	$89,1 \pm 1,8^a$
$PSS_{am-8}^{(1s, 10C)(**)}$	$\sim 76^c$

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Previamente vimos que  $PSS_{am-8}^{(4s, -20C)}$  y  $PSS_{am-8}^{(1s, 10C)}$  tienen S comparables y significativamente menores respecto  $PSS_{am-8}$  ( $p < 0,05$ ; Tabla 29) indicando que el almacenamiento del suero isoeléctrico en ambas condiciones redujo la S.

## ***Solubilidad y propiedades fisicoquímicas***

El almacenamiento de estas proteínas obtenidas con modificaciones preparativas produce una reducción adicional significativa en su S. La mayor pérdida de S fue registrada para PSS<sub>am-8</sub><sup>(1s, 10C)</sup> y puede ser explicado en base al mayor grado de desnaturalización alcanzado (sección 4.2.2.2).

Los estudios de solubilidad en agua destilada analizados en las secciones previas permitieron establecer que, las proteínas aisladas a partir de los sueros líquidos son más solubles que las obtenidas a partir de los sueros deshidratados ya que se evita la pérdida de solubilidad debido al proceso de secado. El rango de S para las proteínas aisladas a partir de sueros líquidos y deshidratados se encuentra entre 85-97 y 70-84% respectivamente (Tablas 25-26). Adicionalmente la S de PSSL y PSSLC (90-180°C) fueron aún menores debido a que se sumó a la pérdida de S debido al secado la merma en la S debido al aislamiento. La S de estas proteínas se ubica en el rango 35-74% (Tabla 28), presentando las mismas una coloración bastante intensa que dificultó algunas determinaciones tales como la hidrofobicidad superficial debido a la presencia de productos de Maillard.

Por lo dicho, se eligieron a las proteínas aisladas a partir de los sueros líquidos enfocando el estudio en los cambios estructurales producidos sobre las proteínas debido a los sueros de partida (ST y SS) y para éste último suero los efectos sobre las proteínas debido a variaciones en el pH y metodología de aislamiento.

Dado que los estudios que se verán luego requieren de condiciones de pH y fuerza iónica controlada como la que puede proveer un buffer se analiza a continuación la S en buffer fosfato de sodio 10 mM (pH 7,0).

### **5.6 Solubilidad proteica en buffer. Efecto del calentamiento**

*Solubilidad en buffer respecto a solubilidad en agua destilada:* Las S halladas al 1,0% en buffer fosfato de sodio 10 mM (pH 7,0) de las proteínas aisladas (Tabla 32) son comparables a las encontradas en agua destilada a la misma concentración. La S en agua destilada de ASN fue dada en la Tabla 29, mientras que la de las proteínas de suero de soja y tofu se encuentra en la Tabla 26.

Los resultados indican que la solubilidad en buffer fosfato, al igual que en agua destilada, de las muestras PSS obtenidas por *salting out* tienen una S significativamente mayor cuando son aisladas a partir de SS con pH 8,0 que con pH 4,5 ( $p < 0,05$ ; Tablas 26 y 32). Del mismo modo, la S de las proteínas aisladas con acetona son significativamente

## *Solubilidad y propiedades fisicoquímicas*

menores respecto de la S de PSS<sub>am-8</sub>. La combinación de ambos factores, SS ácido y precipitación con acetona conduce a la obtención de las proteínas con la menor solubilidad tanto en buffer fosfato como en agua.

**Tabla 32:** Solubilidad en buffer fosfato 10 mM (pH 7,0) al 0,1 y 1,0% p/v de proteínas aisladas antes y después de un tratamiento térmico desnaturizante (100°C, 5 min.). El tratamiento térmico fue realizado en el buffer de disolución. La nomenclatura de las muestras fue dada en las Tablas 26 y 29.

Muestras	Sin tratamiento térmico		Con tratamiento térmico	
	0,1 (% p/v)	1,0 (% p/v)	0,1 (% p/v)	1,0 (% p/v)
ASN	98,5 ± 1,3 <sup>a</sup> <sub>1</sub>	97,6 ± 1,4 <sup>a</sup> <sub>1</sub>	96,3 ± 2,2 <sup>a</sup> <sub>1</sub>	91,8 ± 1,5 <sup>a</sup> <sub>2</sub>
PSS <sub>am-8</sub>	96,5 ± 1,2 <sup>a</sup> <sub>1</sub>	95,1 ± 1,9 <sup>a</sup> <sub>1</sub>	91,4 ± 1,7 <sup>b</sup> <sub>2</sub>	87,6 ± 1,7 <sup>b</sup> <sub>3</sub>
PSS <sub>am-4,5</sub>	88,8 ± 1,0 <sup>b</sup> <sub>1</sub>	85,5 ± 1,2 <sup>b</sup> <sub>2</sub>	88,2 ± 1,2 <sup>c</sup> <sub>1</sub>	79,4 ± 1,2 <sup>c</sup> <sub>3</sub>
PSS <sub>ac-8</sub>	88,1 ± 0,7 <sup>b</sup> <sub>1</sub>	87,4 ± 2,0 <sup>b</sup> <sub>1</sub>	86,4 ± 2,1 <sup>c</sup> <sub>1</sub>	81,5 ± 2,2 <sup>c</sup> <sub>2</sub>
PSS <sub>ac-4,5</sub>	86,5 ± 1,6 <sup>b</sup> <sub>1</sub>	85,4 ± 1,3 <sup>b</sup> <sub>1</sub>	77,5 ± 2,6 <sup>d</sup> <sub>2</sub>	72,2 ± 1,6 <sup>d</sup> <sub>3</sub>
PST <sub>ac-5,5</sub>	80,8 ± 2,7 <sup>c</sup> <sub>1</sub>	80,5 ± 2,3 <sup>c</sup> <sub>1</sub>	78,6 ± 1,2 <sup>d</sup> <sub>2</sub>	73,7 ± 1,3 <sup>d</sup> <sub>3</sub>

Letras superíndices diferentes indican valores medios significativamente diferentes en una misma columna; números subíndices diferentes en una misma fila indican valores medios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Para ayudar a explicar estos resultados podemos analizar los mecanismos por el que las proteínas son precipitadas por ambos métodos y relacionarlo con las S halladas. En la sección 5.5 se mencionó que, la precipitación isoeléctrica permite separar las globulinas de reserva de las proteínas de suero que permanecen solubles debido a su mayor solubilidad, menor PM y a su naturaleza hidrofílica requiriéndose del agregado de agentes precipitantes adicionales tales como la acetona o el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para inducir su precipitación.

Cuando una proteína se encuentra en agua adopta un plegamiento que oculta una gran cantidad de sitios hidrofóbicos en su interior. Sin embargo poseen grupos hidrofóbicos expuestos o “*patches*” que pueden ser cuantificados mediante el uso de sondas hidrofóbicas fluorescentes que se pegan a los mismos y tienen la capacidad de fluorescer dando un parámetro conocido como hidrofobicidad superficial ( $H_0$ ). De esta forma proteínas con una mayor  $H_0$  tendrán una mayor tendencia a interaccionar, formar agregados y ser menos solubles que aquellas proteínas con una menor  $H_0$ . Desde luego que la S dependerá no solo de la cantidad sino del tamaño de los *patches* que tenga la proteína. La precipitación de las proteínas por *salting out* se produce por el agregado de cantidades importantes de sales neutras (como el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) que reducen la cantidad de moléculas de agua capaces de interaccionar con estos *patches* favoreciendo la interacción entre ellos y, consecuentemente, la precipitación de las proteínas (Scopes, 1982). Por lo dicho, la

## *Solubilidad y propiedades fisicoquímicas*

precipitación por *salting out* es fuertemente dependiente de la hidrofobicidad superficial, pero también dependerá del pH. Si bien altas concentraciones de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  lograrán precipitar las proteínas a pH 4,5 u 8,0 en esta última condición las PSS estarán alejadas de su  $P_i$  teniendo una carga neta y una estructura más desplegada (referencia pH  $\approx P_i$ ), lo cual puede explicar porque la S de PSS<sub>am-8</sub> es significativamente mayor que la de PSS<sub>am-4,5</sub> ( $p < 0,05$ ; Tabla 32).

Por otro lado, la precipitación con acetona (solvente miscible con el agua) es una metodología ampliamente utilizada a escala industrial, en donde el solvente orgánico es agregado sobre una solución que contienen las proteínas a precipitar. En la medida que se agrega acetona a la solución proteica se reduce la actividad acuosa disminuyendo el poder solvente del agua. Esto puede ser explicado en términos del desplazamiento del agua libre o en base a la reducción en la constante dieléctrica del solvente. Siendo las principales causas de precipitación las fuerzas electrostáticas y las de Van der Waals (Scopes, 1982). El empleo de solvente trae aparejado una mayor formación de agregados (comparativamente con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) lo que reduce las diferencias debidas al pH.

*Efecto de la concentración y el tratamiento térmico sobre la solubilidad:* Las S al 0,1% p/v son mayores que las determinadas al 1,0%. Esta mayor S a la menor concentración puede indicar que algunos de los agregados pueden ser disgregados empleando un mayor grado de dilución. Entre las proteínas aisladas por *salting out* el aumento en la S debido a la dilución resulta significativo para PSS<sub>am-4,5</sub> ( $p < 0,05$ ; Tabla 32) lo cual se atribuye al mayor contenido de agregados (referencia PSS<sub>am-8</sub>).

Para las proteínas aisladas con acetona las S resultan comparables con ligeros aumentos en la S debido a la reducción en la concentración entre 0,8-1,3% confirmando que las proteínas aisladas con solvente son menos solubles y presentan menos diferencias en su S. Finalmente PST<sub>ac-5,5</sub> tiene una S significativamente menor respecto de las demás proteínas de suero ( $p < 0,05$ ; Tabla 32) indicando que es la proteína menos soluble, acorde a su mayor grado de desnaturalización y contenido de agregados. Adicionalmente en esta proteína se registra el menor aumento de la S cuando la concentración se reduce, al aumento en la S al bajar la concentración 10 veces es  $< 0,4\%$  mostrando que los agregados presentes en los que participa en calcio tienen la menor tendencia a pasar a la fase soluble o que hay saturación.



## *Solubilidad y propiedades fisicoquímicas*

Al someter a las dispersiones al 0,1 o al 1,0% p/v a un calentamiento a 100°C durante 5 min., se observa un grado de agregación adicional reflejado en una disminución de la S. Esta reducción en la S es de mayor magnitud a mayor concentración (Tabla 32).

Aunque la S al 1,0% p/v es menor que al 0,1% p/v se mantiene el mismo orden con el que se reduce la S que el hallado para las muestras no calentadas:  $PSS_{am-8} > PSS_{ac-8} \geq PSS_{am-4,5} \geq PSS_{ac-4,5} > PST_{ac-5,5}$ .

Las diferencias halladas entre los valores de S al 1,0% p/v son muchos más acentuados dado que se combinan dos efectos: el de la concentración y la mayor agregación térmica a una concentración más alta. La reducción en la solubilidad luego del tratamiento térmico hallado para ambas concentraciones (0,1 y 1,0%) es resultado del efecto de la temperatura en la tasa de desnaturalización y agregación proteica (Hermansson, 1986).

A fin de analizar en la Tabla 32 cuales de los cambios en la S debido al tratamiento térmico son significativos, se utilizarán los subíndices. La dependencia del comportamiento con la concentración se debe al aumento de las interacciones proteína-proteína con la concentración. Por ejemplo, en el ASN la desnaturalización al 0,1% no produce cambios apreciables en la S, mientras que cuando la desnaturalización se lleva a cabo al 1,0% se observa una reducción significativa en la S ( $p < 0,05$ ; Tabla 32).

En las PSS, la desnaturalización al 0,1% da como resultado proteínas con S comparables para  $PSS_{am-4,5}$  y  $PSS_{ac-8}$ , mientras que cuando la desnaturalización se lleva a cabo al 1,0% las reducciones en la S resultan significativas para todas las PSS ( $p < 0,05$ ; Tabla 32).

Nótese que  $PSS_{ac-4,5}$  al ser desnaturalizada al 0,1% reduce significativamente su S y cuando la desnaturalización se lleva a cabo al 1,0% experimenta la mayor disminución en la S (superior al 15%) entre todas las proteínas analizadas. Estos resultados muestran que la combinación de pH ácido y el empleo de solvente como agente precipitante no solo inducen la formación de las proteínas menos solubles, sino que además contiene proteínas (y/o agregados solubles) con una mayor tendencia a la formación agregados insolubles por acción del calor.

Finalmente  $PST_{ac-5,5}$  son las proteínas menos solubles debido a su grado de desnaturalización y debido a la presencia de calcio resultan muy afectadas por el tratamiento térmico dando S significativamente menor luego de la desnaturalización tanto a 0,1 como al 1,0% ( $p < 0,05$ ; Tabla 32).

En 3.2 se analizó la composición de estas proteínas hallándose que el contenido de HC (% p/p) oscilaba entre 0,7-2,8% para ASN y las proteínas aisladas por *salting out* y del 26-30% para las proteínas precipitadas de SS o ST con acetona.

## ***Solubilidad y propiedades fisicoquímicas***

Mediante FTIR de PSS y PST (datos no mostrados) se halló que los carbohidratos (fundamentalmente polisacáridos) se encuentran mayoritariamente en la fracción soluble y no participan en la composición de los agregados proteicos insolubles. Los espectros FTIR de las muestras calentadas y de sus fracciones (soluble e insoluble) fueron prácticamente similares a los no calentados. Este resultado sugiere que la agregación proteica adicional mencionada es debida exclusivamente a proteínas, no participando los polisacáridos en el proceso de agregación.

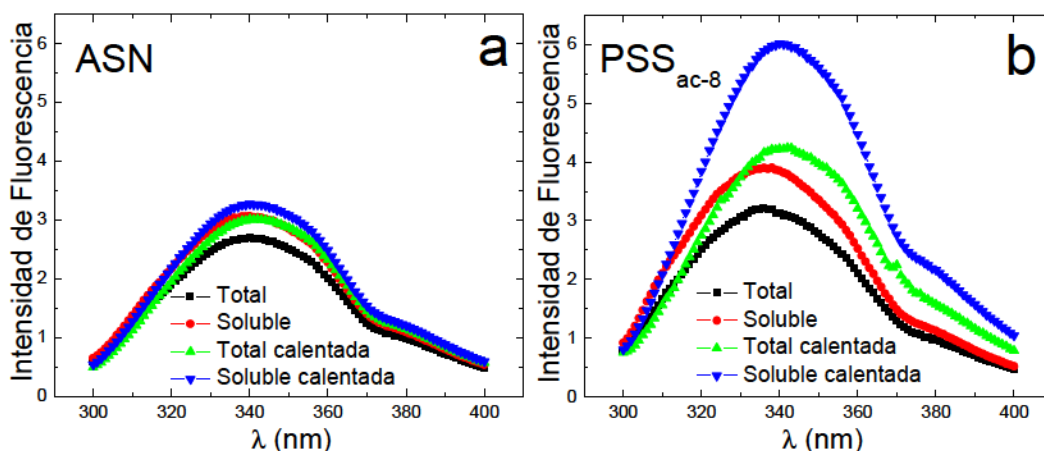
### **5.7 Propiedades fisicoquímicas de proteínas totales y sus fracciones solubles, con y sin calentamiento previo**

#### **5.7.1 Fluorescencia intrínseca**

En las proteínas los residuos de tirosina y triptofano son los responsables de la fluorescencia intrínseca. La fluorescencia del triptofano generalmente es siempre la dominante y en aquellas proteínas que tienen ambos residuos aromáticos es el triptofano el amino ácido que resulta más sensible a los cambios micro estructurales (Eftink, 2000). Por lo dicho nos enfocaremos en los cambios en la fluorescencia de los residuos de triptofano. La intensidad de fluorescencia esta determinada por la polaridad y las características micro ambientales de los residuos de triptofano, lo que permite estudiar cambios en las interacciones y en la conformación de las proteínas, entre proteína-proteína así como la de los ligandos (Pallarès y col., 2004).

La fluorescencia intrínseca (FI) fue determinada como se detalló en 2.12, realizando las determinaciones sobre: i) proteína total (soluble e insoluble), ii) proteína total calentada, iii) proteína soluble y iv) proteína soluble calentada.

Los espectros de FI de las dispersiones conteniendo la proteína total dan resultados diferentes a los hallados con la proteína soluble, tanto para las muestras no calentadas como en las calentadas. A modo de ejemplo de este comportamiento en la Figura 26 se muestran los espectros de fluorescencia intrínseca obtenidos con ASN y PSS<sub>ac-8</sub>. A partir de estos espectros pueden determinarse dos parámetros importantes: la intensidad de fluorescencia (If) y la ubicación del máximo ( $\lambda_{em, max}$ ) en nm. Se encuentran diferencias en ambos parámetros para las fracciones totales y solubles dependiendo del tratamiento térmico.



**Figura 26:** Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca obtenidos con dispersiones proteicas acuosas al 0,1% p/v.  $\lambda$ : longitud de onda. Los espectros total y soluble fueron obtenidos antes y después de centrifugar la dispersión proteica (9300 x g, 20 min., 20°C). Total y soluble calentada corresponden a dispersiones calentadas (100°C, 5 min.) antes y después de centrifugar respectivamente.

Cuando los cromóforos se exponen en mayor grado al solvente se observa un corrimiento en la  $\lambda_{em, max}$  hacia el rojo, mientras que el rendimiento cuántico de fluorescencia ( $\Phi_F$ ) disminuye cuando los cromóforos interactúan con agentes de *quenching* presentes tanto en el solvente como en la proteína en si misma (Shen y Tang, 2012).

Cabe mencionar que el proceso de *quenching* se conoce desde hace décadas y consiste en una disminución en la intensidad registrada debido a procesos de ionización o por interacciones con residuos amino, carboxilos o de triptofano (Freifelder, 1976). La intensidad de fluorescencia máxima ( $I_{f_{max}}$ ) está directamente asociada con el  $\Phi_F$  y a los valores de  $\lambda_{em, max}$ .

Los valores de  $I_{f_{max}}$  y sus respectivas  $\lambda_{em, max}$  de las proteínas estudiadas se muestran en la Tabla 33. Para el caso de la fracción total y soluble de ASN, los valores de  $I_{f_{max}}$  resultan comparables en el rango 2,5-2,7 y se ubican entre 339-340 nm sin cambios significativos en la  $\lambda_{em, max}$  (Tabla 33).

De acuerdo con Eftink (2000) los valores de  $\lambda_{em, max}$  se corresponden con residuos de triptofano parcialmente expuestos sobre la superficie de la proteína. Para la fracción total y soluble del ASN con tratamiento térmico no se producen cambios en la  $\lambda_{em, max}$  que continúa estando a 340 nm, aunque se registra un aumento en la  $I_{f_{max}}$  alcanzando valores comprendidos entre 2,8-3,0. Estos resultados sugieren un cambio en el entorno químico con un aumento del grado de exposición de los residuos de triptofano debido al desplegamiento de la proteína y posterior agregación. Esto se atribuye a residuos de

## *Solubilidad y propiedades fisicoquímicas*

triptofano que se encuentran inmersos en un ambiente de baja polaridad dentro de los agregados solubles.

Por el contrario, un estudio comparativo entre las fracciones totales y solubles de las PSS y PST<sub>ac-5,5</sub> antes y después de realizar el tratamiento térmico revela importantes resultados. Primero, las PSS no calentadas obtenidas mediante precipitación a pH 8,0 con acetona o sulfato de amonio tienen bajos valores de  $\lambda_{em, max}$  (336-338 nm) y simultáneamente altos valores de  $I_{fmax}$  (2,2-3,9) respecto a aquellas proteínas aisladas desde pH 4,5 con valores de  $\lambda_{em, max}$  entre 340 y 342 nm, en los que el corrimiento hacia el rojo indica una mayor exposición al solvente y valores de  $I_{fmax}$  en el rango 1,7 a 2,6 (Tabla 33).

Estos resultados se corresponden con el mayor grado de desnaturalización hallado para las proteínas aisladas desde SS ácido respecto a las obtenidas desde un SS alcalino (sección 4.2.2.1) con diferencias significativas para el aislamiento por *salting out* indicando además un mayor grado de exposición de los residuos de triptofano al solvente.

**Tabla 33:** Valores de intensidad de fluorescencia máxima de dispersiones conteniendo 1,0 mg proteína/ml con o sin tratamiento térmico (100°C, 5 min.). Total y soluble corresponden a dispersiones antes y después de centrifugar (9300 x g, 20 min., 20°C) respectivamente. El valor entre paréntesis corresponde a la longitud de onda de emisión del pico ( $\lambda_{em}$ ).

Muestras	Sin tratamiento térmico		Con tratamiento térmico	
	Total	Soluble	Total	Soluble
ASN	2,7370 (339)	2,4796 (340)	2,9715 (340)	2,8465 (340)
PSS <sub>am-8</sub>	2,2232 (338)	2,4332 (337)	2,8955 (340)	2,9041 (340)
PSS <sub>am-4,5</sub>	1,6810 (342)	1,6609 (342)	2,5432 (344)	2,5516 (343)
PSS <sub>ac-8</sub>	3,2080 (336)	3,9032 (338)	4,2389 (342)	6,0165 (340)
PSS <sub>ac-4,5</sub>	2,6249 (340)	2,6143 (340)	4,2068 (342)	4,5021 (342)
PST <sub>ac-5,5</sub>	1,2932 (348)	1,3401 (352)	1,2564 (350)	1,1605 (351)

Valores promedio con una desviación máxima del 3%.

Segundo, comparando las PSS precipitadas con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> respecto a las obtenidas con acetona a pH 4,5 u 8,0 se encuentran valores más altos de  $I_{fmax}$  y un ligero corrimiento hacia el azul de la  $\lambda_{em, max}$  para PSS<sub>ac-4,5</sub> y PSS<sub>ac-8</sub>. Estos resultados están directamente relacionados con el mayor grado de desnaturalización de las proteínas aisladas desde un SS ácido con la posterior formación de agregados solubles e insolubles.

Tercero, luego del tratamiento térmico se aprecia un aumento significativo de la  $I_{fmax}$  de las fracciones solubles respecto a las fracciones totales para PSS<sub>ac-8</sub> y en menor magnitud para PSS<sub>ac-4,5</sub> (p<0,05; Tabla 33). Dado que no hay un corrimiento evidente de la  $\lambda_{em, max}$  hacia



## ***Solubilidad y propiedades fisicoquímicas***

el rojo se postula que los agregados insolubles ocluyen proteína soluble. En estas condiciones los residuos de triptofano ocultos tienen bajo  $\phi_F$  debido a reacciones de atenuación (*quencheo*). La centrifugación permite la migración de agregados de proteína y la liberación de proteína soluble produciendo los incrementos en la  $I_{f_{max}}$ . Esta liberación modifica dramáticamente el medio ambiente en el que se halla la proteína, dando un notable incremento de la  $I_{f_{max}}$  ( $I_{f_{max}} > 6$ ; Tabla 33).

Finalmente, para las fracciones totales y solubles de  $PST_{ac-5,5}$ ,  $\lambda_{em, max}$  está próximo a 350 nm lo que corresponde a residuos de triptofano totalmente expuestos (Eftink, 2000). La ausencia de cambios significativos en los valores de  $\lambda_{em, max}$  tras el calentamiento muestra que los residuos de triptofano están totalmente expuestos al solvente, mientras que la baja  $I_{f_{max}}$  puede ser atribuida a reacciones de *quenching* promovidas por iones calcio (u otras sales) de acuerdo al alto contenido mineral en la muestra  $PST_{ac-5,5}$ . Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por FTIR (datos no mostrados) en donde a partir de los espectros fue posible identificar restos de triptofano en un entorno más polar debido a la presencia de sales de calcio.

### **5.7.2 Hidrofobicidad superficial**

La hidrofobicidad superficial ( $H_0$ ) fue determinada como se detalló en 2.12 empleando la sonda fluorescente 8-naftalen sulfonato de sodio (ANS). La intensidad de fluorescencia relativa se determinó sobre muestras equivalentes a las empleadas para medir la fluorescencia intrínseca.

Las medidas de  $H_0$  revelan diferencias estructurales entre las muestras. Las PSS que no han sido calentadas exhiben valores de  $H_0$  significativamente menores que los hallados para el ASN no calentado ( $p < 0,05$ ; Tabla 34). Esta diferencia está de acuerdo con trabajos previos (Sorgentini y Wagner, 1999; Mitidieri y Wagner, 2002).

La  $H_0$  de la fracción soluble del ASN sin tratamiento térmico es menor que la  $H_0$  de la fracción total (Tabla 34). Como fue ya demostrado por Sorgentini y col. (1995) en aislados de soja comercial y de laboratorio, la fracción insoluble está formada por proteínas más desnaturalizadas y de mayor hidrofobicidad superficial que las que se mantienen solubles. Adicionalmente, es bien sabido que los valores de  $H_0$  de las fracciones totales e insolubles son, en algunos casos, substancialmente diferentes teniendo la fracción insoluble un notable impacto sobre la hidrofobicidad superficial.

## *Solubilidad y propiedades fisicoquímicas*

Para la medición de la hidrofobicidad superficial, es requisito que las dispersiones proteicas sean límpidas. Las altas diluciones utilizadas (hasta 1:1000) permiten que los agregados insolubles sean convertidos de manera parcial o total en agregados solubles.

**Tabla 34:** Hidrofobicidad superficial ( $H_0$ ) determinada por el método de Kato y Nakai (Kato y Nakai, 1980; Haskard y Li-Chan, 1998), empleando la sonda ANS.

Muestras	Sin tratamiento térmico		Con tratamiento térmico (100°C; 5 min.)	
	Total	Soluble	Total	Soluble
ASN	386,82 ± 0,53 <sup>a</sup> <sub>1</sub>	263,82 ± 0,31 <sup>a</sup> <sub>2</sub>	665,51 ± 0,82 <sup>a</sup> <sub>3</sub>	509,82 ± 0,62 <sup>a</sup> <sub>4</sub>
PSS <sub>am-8</sub>	53,43 ± 0,07 <sup>b</sup> <sub>1</sub>	51,64 ± 0,06 <sup>b</sup> <sub>2</sub>	161,11 ± 0,23 <sup>b</sup> <sub>3</sub>	300,35 ± 0,93 <sup>b</sup> <sub>4</sub>
PSS <sub>am-4,5</sub>	69,06 ± 0,08 <sup>c</sup> <sub>1</sub>	33,40 ± 0,92 <sup>c</sup> <sub>2</sub>	260,77 ± 0,29 <sup>c</sup> <sub>3</sub>	155,47 ± 0,25 <sup>c</sup> <sub>4</sub>
PSS <sub>ac-8</sub>	16,82 ± 0,02 <sup>d</sup> <sub>1</sub>	13,50 ± 0,01 <sup>d</sup> <sub>2</sub>	218,53 ± 0,34 <sup>d</sup> <sub>3</sub>	261,01 ± 0,37 <sup>d</sup> <sub>4</sub>
PSS <sub>ac-4,5</sub>	53,85 ± 0,40 <sup>b</sup> <sub>1</sub>	31,64 ± 0,89 <sup>c</sup> <sub>2</sub>	304,65 ± 1,21 <sup>e</sup> <sub>3</sub>	218,34 ± 0,64 <sup>e</sup> <sub>4</sub>
PST <sub>ac-5,5</sub>	69,03 ± 0,09 <sup>c</sup> <sub>1</sub>	96,42 ± 0,11 <sup>e</sup> <sub>2</sub>	82,82 ± 0,10 <sup>f</sup> <sub>3</sub>	61,82 ± 0,76 <sup>f</sup> <sub>4</sub>

Letras superíndices diferentes indican valores medios significativamente diferentes en una misma columna; números subíndices diferentes en una misma fila indican valores medios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

El conocimiento de los valores de  $H_0$  de la fracción total y la soluble permite la estimación de la  $H_0$  de la fracción insoluble ( $H_{0,I}$ ) aplicando las ecuaciones 18 y 19:

$$H_{0,T} = \%S \cdot H_{0,S} + \%I \cdot H_{0,I} \quad (18)$$

$$H_{0,I} = (100 \cdot H_{0,T} - \%S \cdot H_{0,S}) / (100 - \%S) \quad (19)$$

Siendo  $H_{0,T}$  y  $H_{0,S}$  los valores de hidrofobicidad superficial medidos en la dispersión total y en la fracción soluble (Tabla 34), en tanto que  $H_{0,I}$  es la hidrofobicidad superficial estimada en la fracción insoluble y  $\%S$  la solubilidad a 0,1% p/v (Tabla 32).

La estimación de  $H_{0,I}$  para ASN arrojó un valor  $\approx 32$  veces mayor que el de la fracción soluble. Sorgentini y col. (1995) también informaron para un ASN de laboratorio no calentado que  $H_0$  de la fracción insoluble era mayor respecto de la fracción soluble. La menor hidrofobicidad de esta última fue explicada en base al menor grado de desnaturalización de las proteínas solubles en donde las zonas hidrofóbicas de 7S y 11S están orientadas hacia el interior de la molécula lo cual esta de acuerdo con la típica estructura globular del aislado nativo.

## ***Solubilidad y propiedades fisicoquímicas***

Para las PSS,  $H_{0,I}$  depende del pH del SS. En las PSS precipitadas a pH 8,0  $H_{0,I}$  se ubica entre 41,4 y 84,2 mientras que para las precipitadas a pH 4,5 la estimación de  $H_{0,I}$  se encuentra entre 196,2 y 351,8.

La mayor hidrofobicidad hallada para las proteínas aisladas a partir de SS ácido se corresponde con el mayor grado de desnaturalización de estas últimas (sección 4.2.2.1).

Como fue mencionado, en las  $PST_{ac-5,5}$  las fracciones proteicas (ITK y L) presentan una desnaturalización avanzada y los residuos de triptofano están totalmente expuestos al solvente. La oclusión de los dominios hidrofóbicos debidos al calcio que media las reacciones de agregación puede explicar los bajos valores de  $H_{0,I}$  ( $\approx 90$ ).

Como era de esperar y en concordancia con trabajos previos (Sorgentini y col., 1995; Wagner y col., 1996; Wagner y col., 2000 y Mitidieri y Wagner, 2002) la desnaturalización térmica de las muestras proteicas provoca un aumento muy marcado del valor de  $H_0$  persistiendo la diferencia entre los aislados y las proteínas de suero.

Las globulinas de reserva y sus fracciones mayoritarias, glicinina y  $\beta$ -conglucina, son proteínas oligoméricas de alta masa molecular con una estructura cuaternaria estabilizada mediante interacciones hidrofóbicas. Cuando estas proteínas son desnaturalizadas térmicamente en soluciones acuosas exponen sus sitios hidrofóbicos los cuales son más numerosos que los hallados en las PSS. Las PSS son proteínas biológicamente activas con una composición aminoácida más hidrofílica (Sorgentini y Wagner, 1999).

En el ASN la hidrofobicidad de la muestra calentada es  $\approx 1,7$  veces mayor que la del ASN no calentado (Tabla 34), en tanto que empleando la Ec. 19 se obtiene que  $H_{0,I}$  de ASN desnaturalizado es 9,2 veces mayor respecto a la fracción soluble.

Sorgentini y col. (1995) analizaron la desnaturalización térmica de un ASN de laboratorio en dispersiones acuosas de diferente concentración (5-15% p/p) hallando para la menor concentración ensayada el mayor incremento de  $H_0$  ( $\approx 1,5$  veces) similar al nuestro. Estos autores explicaron el mayor aumento de la hidrofobicidad superficial a baja concentración con base a la menor tendencia que tienen las proteínas desnaturalizadas a baja concentración a formar agregados, lo que permite exponer una mayor cantidad de sitios hidrofóbicos al medio acuoso.

De forma equivalente a nuestros resultados, estos autores hallaron en las proteínas desnaturalizadas una mayor hidrofobicidad para la fracción insoluble respecto a la soluble y atribuyeron este comportamiento en base a la fuerte tendencia a la agregación proteica

## ***Solubilidad y propiedades fisicoquímicas***

como resultado de las interacciones hidrofóbicas, alta temperatura y el elevado grado de desnaturalización alcanzado.

Sin embargo, en los agregados formados en estas condiciones de baja concentración los sitios expuestos debidos a la desnaturalización que estarán involucrados en la formación de agregados serán pocos respecto del total (bajo número de puntos de interacción entre cadenas polipeptídicas) teniendo consecuentemente una mayor hidrofobicidad.

Como se mencionó en 5.7.1 los valores de  $I_{fmax}$  son menores para PSS<sub>am-4,5</sub> y PSS<sub>ac-4,5</sub> respecto a aquellas precipitadas desde un SS con un pH de 8,0.

En este caso se observa un comportamiento opuesto con las medidas de  $H_0$ . Un análisis comparativo entre la fracción total y soluble de PSS<sub>am-4,5</sub> y PSS<sub>ac-4,5</sub> calentado revela que los valores de  $H_0$  son muy superiores para estas últimas muestras.

Este resultado sugiere que durante el paso de precipitación a pH 4,5 cercano al  $P_i$  de las proteínas de suero (Pallansch y Liener, 1953; Wang, 1971) se induce la formación de agregados proteicos de estructura cerrada y que estos agregados liberan proteínas hidrofóbicas ocluidas durante la extrema dilución en que se realiza la medida.

En contraste para PSS<sub>am-8</sub> y PSS<sub>ac-8</sub> calentadas los valores de  $H_0$  son siempre mayores en la fracción soluble. En estas proteínas los agregados son formados mediante interacciones no hidrofóbicas. Consecuentemente, se forman agregados proteicos abiertos altamente hidratados.

De manera equivalente a como se halló a partir de las determinaciones de  $I_f$  los agregados proteicos obtenidos por precipitación a pH 8,0 ocluyen proteínas hidrofóbicas, las cuales son fácilmente liberadas durante la etapa de centrifugación y contribuyen a aumentar la  $H_0$  de la fracción soluble.

Finalmente, se observó que la  $H_0$  de PST<sub>ac-5,5</sub> disminuye tras el calentamiento. Sus proteínas principales (ITK y L) ya están totalmente desnaturalizadas, por lo que el calentamiento no logra una mayor exposición de sitios hidrofóbicos, sino por el contrario, se induce una mayor oclusión de los mismos por una agregación adicional.

### **5.8 Comportamiento superficial**

El comportamiento superficial de las proteínas aisladas fue analizado por medidas de tensiometría realizadas como se detalló en 2.13 obteniendo gráficos de tensión superficial ( $\gamma$ ) en mN/m en función del tiempo de formación de gota.



## *Solubilidad y propiedades fisicoquímicas*

La capacidad tensioactiva de una proteína puede verse reflejada tanto en la velocidad de adsorción en la interfase aire-agua ( $V_a$ ) como en la tensión superficial de equilibrio ( $\gamma_e$ ).

En la Figura 4, sección 2.13.1 se mostró en un mismo gráfico el comportamiento superficial del buffer con y sin el agregado de la proteína de estudio. La  $\gamma$  para el buffer fosfato de sodio 10mM pH 7,0 comenzó con un valor  $73,8 \pm 0,2$  mN/m el cual se mantuvo prácticamente constante. Cuando se analizó el buffer con la proteína la  $\gamma$  comenzó desde un valor significativamente menor y fue disminuyendo en la medida que la proteína migró a la interfase disminuyendo la  $\gamma$  hasta alcanzar una  $\gamma_e$  mínima.

Graham y Phillips (1979) y Damodaran y Song (1988), hallaron un comportamiento similar analizando el comportamiento de proteínas en la interfase aire-agua utilizando un tensiómetro de gota; los cambios en la  $\gamma$  en función del tiempo fueron asociados a la adsorción de la proteína en la interfase. Innocente y col. (2011) atribuyeron la disminución de la  $\gamma$  con el tiempo en un tensiómetro de gota al mayor tiempo que tienen las moléculas para posicionarse uniformemente en la interfase y desarrollar su actividad surfactante.

Romero y col. (2011) analizaron el comportamiento de proteínas de suero tales como la  $\beta$ -lactoglobulina a pH 6,5 empleando un tensiómetro de gota Lauda TVT2, hallando que la variación en la presión superficial resultó mayor en la fracción de menor PM.

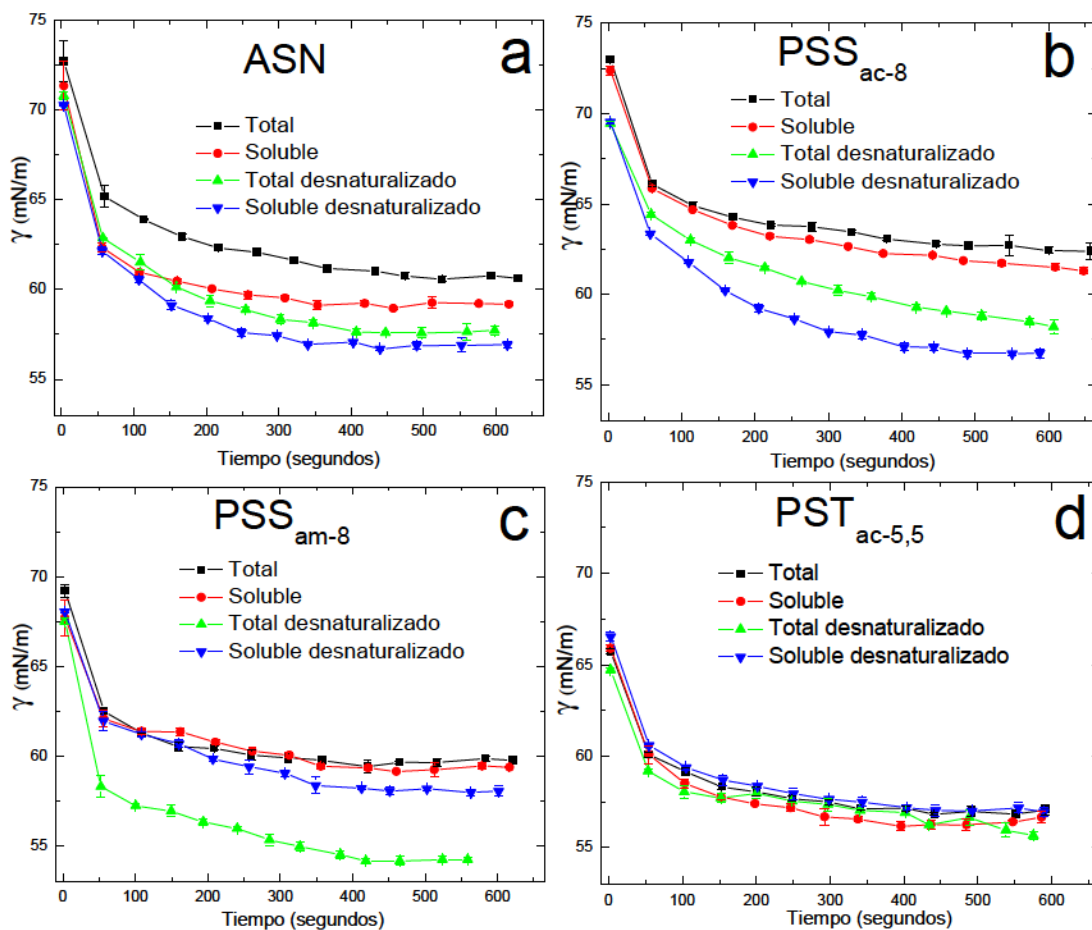
Cabe mencionar que en las proteínas, la actividad superficial está dada por un balance entre grupos hidrofílicos e hidrofóbicos y la capacidad de la proteína de incorporarse a la interfase. Para que esto ocurra, resulta necesario que la proteína migre desde el seno de la solución hacia la interfase, posteriormente se adsorba, despliegue y pueda anclarse en la misma disminuyendo la energía libre del sistema. Este proceso continúa hasta que la sustancia incorporada a la interfase genera repulsiones electrostáticas y restricciones estéricas suficientes como para prevenir la incorporación de más moléculas.

En la Figura 27 se muestra la dependencia del comportamiento superficial al utilizar la dispersión total o soluble (sin tratamiento térmico) y de las mismas fracciones luego de ser sometidas a un tratamiento térmico.

Para ASN las 4 dispersiones proteicas analizadas (total o soluble con o sin tratamiento térmico) comenzaron con valores de tensión superficial iniciales ( $\gamma_i$ ) similares ubicados en el rango 70-73 mN/m, siendo la proteína que disminuye en menor grado la  $\gamma_i$  respecto al buffer alcanzando  $\gamma_e$  aproximadamente equidistantes que disminuyen siguiendo el orden: proteína total > proteína soluble > proteína total desnaturalizada > proteína soluble desnaturalizada con valores de 60, 59, 58 y 57 mN/m respectivamente. Estos resultados

## Solubilidad y propiedades fisicoquímicas

indican que los agregados eliminados durante la centrifugación tienen una menor capacidad de reducir la tensión (referencia dispersión total) y que la desnaturalización mejora las propiedades superficiales reduciendo la  $\gamma_e$ .



**Figura 27:** Comportamiento superficial determinado por tensiometría de gota para diferencias proteínas aisladas. Se grafica la tensión superficial ( $\gamma$ ) en función del tiempo de dispersiones conteniendo 1,0 mg proteína/ml buffer fosfato 10 mM pH 7,0. El tratamiento de las muestras es el detallado en la Tabla 33

Con PSS<sub>ac-8</sub> se halla un comportamiento diferencial debido al tratamiento térmico. Para la proteína total o soluble no calentada los valores de  $\gamma_i$  fueron similares (72,5-73,0 mN/m) y comparables a los hallados con ASN, alcanzando un  $\gamma_e$  entre 61-62 mN/m, dando una menor reducción en la  $\gamma_e$  respecto a ASN. Por el contrario, en la PSS<sub>ac-8</sub> calentada los gráficos comienzan con un  $\gamma_i \approx 69,5$  mN/m (menor que con ASN) alcanzando un valor de  $\gamma_e$  entre 57-58 mN/m para proteína total y soluble desnaturalizada equivalente al ASN. Estos resultados indican que el tratamiento térmico mejora las propiedades superficiales de la proteína ya que disminuye significativamente la  $\gamma_i$  y la  $\gamma_e$ .

## *Solubilidad y propiedades fisicoquímicas*

Con PSS<sub>am-8</sub> se obtienen valores de  $\gamma_i$  similares para las 4 fracciones (como con ASN) pero con valores de  $\gamma_i$  en el rango 67-69 mN/m, los cuales son menores que los hallados para ASN y PSS<sub>ac-8</sub> indicando el mejor comportamiento superficial de PSS<sub>am-8</sub>. En el equilibrio se observa un comportamiento similar para la proteína total y la proteína soluble con o sin tratamiento térmico las cuales alcanzan  $\gamma_e$  entre 58-60 mN/m. En contraste, el comportamiento de PSS<sub>am-8</sub> total desnaturalizada presenta una drástica reducción de la  $\gamma \approx 8$  mN/m durante el primero minuto de medida que da cuenta de la alta velocidad de adsorción en la interfase aire-agua para esta muestra.

Finalmente, la muestra PST<sub>ac-5,5</sub> produce la mayor reducción inicial en la  $\gamma$  (referencia buffer fosfato) con valores de  $\gamma_i$  entre 65-67 mN/m y  $\gamma_e$  entre 55-57 mN/m.

A partir de medidas del buffer solo o con la presencia de las 6 proteínas analizadas se determinó:  $V_a$ : velocidad de adsorción en la interfase aire-agua y  $\gamma_e$ : la tensión superficial de equilibrio como se detalló en 2.13.1 y 2.13.2 respectivamente. Los resultados de estas determinaciones se encuentran en la Figura 28a.

Para el caso del ASN la  $V_a$  resulta equivalente para la fracción total y para las fracciones calentadas (total o soluble), hallándose una  $V_a$  significativamente mayor para la fracción soluble total, posiblemente por el efecto negativo de los agregados presentes en la fracción total con  $V_a$  menores (referencia fracción soluble).

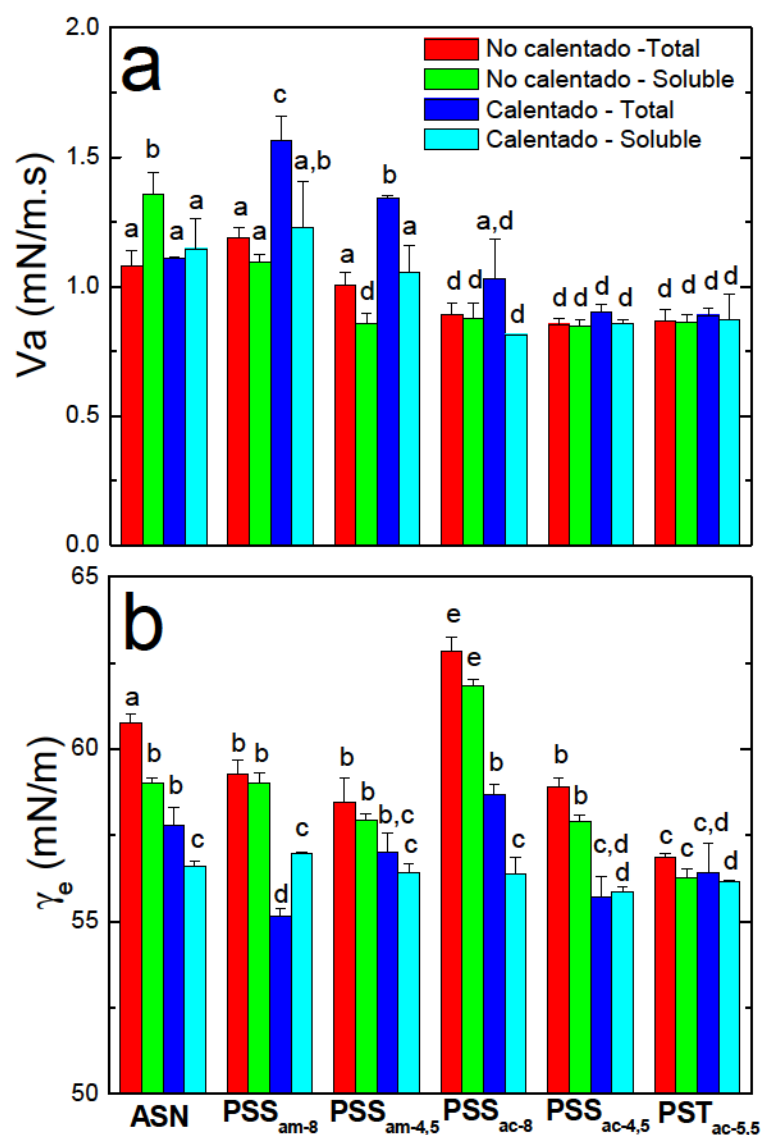
Entre las proteínas de suero, PSS<sub>am-8</sub> es la única que presenta valores de  $V_a$  comparables a los de ASN. PSS<sub>am-8</sub> exhibe valores comparables entre la fracción no calentada (total o soluble) y la fracción calentada soluble. En contraste la fracción calentada total de PSS<sub>am-8</sub> presenta la mayor  $V_a$  entre todas las proteínas analizadas ( $p < 0,05$ ; Figura 28a). Este comportamiento indica que los agregados presentes en PSS<sub>am-8</sub> tienen actividad superficial o se disocian por aproximación a la interface liberando proteínas que pueden ser adsorbidas en la interfase agua/aire. Un comportamiento similar se observa con la dispersión total de PSS<sub>am-4,5</sub>.

De esta forma, los agregados en el ASN no calentado tienen  $V_a$  menores respecto a la fracción soluble ya que al ser eliminados, este parámetro aumenta significativamente ( $p < 0,05$ ; Figura 28a). Por el contrario, la  $V_a$  de los agregados en PSS<sub>am-8</sub> o PSS<sub>am-4,5</sub> no calentados tienen  $V_a$  mayores que las correspondientes fracciones solubles, dado que se registra una reducción en la  $V_a$  en la fracción soluble respecto a la fracción total.

## Solubilidad y propiedades fisicoquímicas

La  $V_d$  de los agregados aumenta significativamente con el tratamiento térmico para ambas proteínas aisladas por *salting out*, razón por la cual la  $V_d$  de la fracción soluble calentada es significativamente menor respecto de la calentada total.

$PSS_{ac-4,5}$  y  $PST_{ac-5,5}$  tienen el mismo comportamiento difusional, ya sea en dispersiones totales o solubles y no mejoran con el calentamiento. Estos resultados indican que las proteínas precipitadas por *salting out* se adsorben más rápidamente que las precipitadas por acetona.



**Figura 28:** Comportamiento superficial de fracciones totales y solubles con o sin tratamiento térmico. Las fracciones fueron obtenidas a partir de dispersiones conteniendo un 1,0 mg proteína/ml buffer fosfato 10 mM pH 7,0.  $V_a$ : Velocidad de adsorción en la interfase aire-agua.  $\gamma_e$ : Tensión superficial de equilibrio



## *Solubilidad y propiedades fisicoquímicas*

La tensión superficial de equilibrio registra un comportamiento diferente (Figura 28b). Para ASN la tendencia observada es que las fracciones solubles den valores  $\gamma_e$  significativamente menores que las totales y las calentadas den menores valores de  $\gamma_e$  que las no calentadas. Una tendencia similar se observa para las PSS con respecto al calentamiento, en todos los casos la capacidad tensioactiva mejora en las proteínas desnaturizadas, posiblemente por el aumento de su hidrofobicidad superficial (Kato y Nakai, 1980).

Excepto la muestra PSS<sub>ac-8</sub>, después del calentamiento tanto las dispersiones totales como la fracción soluble dieron valores de  $\gamma_e$  en el rango 55-57 mN/m, que iguala a los correspondiente a la fracción soluble calentada de ASN y concuerda con el de otras proteínas de buenas propiedades superficiales. En el caso particular de PSS<sub>am-8</sub>, la dispersión total calentada da un valor de  $\gamma_e$  significativamente menor que el de la fracción soluble calentada, lo cual concuerda con su comportamiento difusional y con que las proteínas agregadas tienen actividad superficial (Figura 28a).

Los valores  $\gamma_e$  para las fracciones solubles de la mayor parte de las PSS calentadas son semejantes, lo cual apoya más la idea de que las diferencias en el comportamiento superficial de las proteínas totales se debe al aporte de la fracción insoluble, que es positivo en la muestra PSS<sub>am-8</sub>, pero negativo en la PSS<sub>ac-8</sub>.

Las PSS precipitadas en medio ácido tienen agregados insolubles que no interfieren en el comportamiento superficial de las proteínas solubles. Los altos valores de hidrofobicidad superficial de las proteínas insolubles en estas muestras (sección 5.7.2) inducirían más a que interactúen entre sí que con la interfase.

La muestra PST<sub>ac-5,5</sub> tiene un comportamiento particular debido a que las fracciones totales o solubles, calentadas o no, alcanzan valores de tensión de equilibrio comparables, lo que junto con los resultados de velocidad difusional la convierten en una muestra con una interesante performance aún con su avanzado grado de desnaturización y agregación mediado por calcio.

Entre las PSS la muestra PSS<sub>ac-8</sub> fue la menos tensioactiva con bajos valores de  $V_a$  y los valores más altos de  $\gamma_e$ , lo cual puede tener relación con cambios conformacionales en la estructura de sus proteínas que se manifiestan por los altos valores de intensidad de fluorescencia intrínseca tanto antes como después del calentamiento (Figura 26, sección 5.7.1).

## *Solubilidad y propiedades fisicoquímicas*

El comportamiento superficial de las dispersiones solubles de las muestras PST<sub>ac-5,5</sub> y PSS<sub>ac-4,5</sub> calentadas resulta comparable al de otras muestras lo que permite inducir que la presencia de polisacáridos solubles no ejerce ningún efecto negativo en proceso de adsorción superficial.

Las cinéticas de adsorción superficial de las fracciones solubles de ASN y PSS para tiempos inferiores al equilibrio (< 250 s) realizadas por FTIR (datos no mostrados) permitieron establecer que, las proteínas térmicamente desnaturalizadas son efectivamente más adsorbidas que las no desnaturalizadas, lo cual significa una mayor velocidad de adsorción. Adicionalmente, las diferencias entre las intensidades de las muestras con y sin calentamiento es mucho menor que las halladas entre los valores  $\gamma_e$ , lo cual sugiere que además de haber una mayor adsorción superficial de las proteínas calentadas, estas tienen una mayor efectividad como agentes tensioactivos debido a su estructura con un mejor balance hidrofílico-hidrofóbico. Los ensayos tensiométricos para las muestras ASN, PSS<sub>am-8</sub> y PST<sub>ac5,5</sub> indican que tienen propiedades superficiales equivalentes (Figura 28).

Analizando los resultados en conjunto, se puede ver que las muestras ensayadas si bien tienen buenas propiedades tensioactivas hay diferencias entre ellas, las cuales no son fácilmente justificables en base a la composición y a las propiedades estructurales-conformacionales estudiadas. La hidrofobicidad superficial y la fluorescencia intrínseca, nos indican que hay diferencias estructurales marcadas entre las muestras, pero que no necesariamente son las que definen las diferencias en el comportamiento superficial.

Queda claro que tanto para las proteínas de reserva, las de suero de soja o las provenientes del suero de tofu, las que exhiben las mejores propiedades superficiales son las que están desnaturalizadas, aun cuando no tengan los valores más altos de hidrofobicidad superficial. La muestra PST<sub>ac-5,5</sub> con proteínas más hidrofílicas tiene un comportamiento superficial comparable a muestras que poseen proteínas más hidrofóbicas como las PSS<sub>ac-4,5</sub> y ASN, pero todas éstas no superan al comportamiento que exhibe la dispersión total de PSS<sub>am-8</sub>, que justamente tiene una hidrofobicidad intermedia.

### **5.9 Conclusiones parciales**

En los sueros líquidos de partida la totalidad de las proteínas se encuentran solubles, mientras que en los sueros deshidratados la cantidad de proteína soluble depende tanto del suero como del proceso de secado. La solubilidad de las proteínas en los sueros liofilizados

## ***Solubilidad y propiedades fisicoquímicas***

se reduce debido a la formación de agregados durante la congelación, reducción que es mucho mayor cuando se realiza un secado térmico debido al proceso de desnaturalización-agregación de las proteínas durante el calentamiento.

La solubilidad de las proteínas aisladas a partir de los sueros líquidos depende del suero de partida, del ajuste del pH y del método de aislamiento, siendo las proteínas más solubles las obtenidas por *salting out* a partir de suero a pH: 8,0 y las menos solubles las aisladas a partir del suero de tofu con acetona a pH: 5,5. Modificaciones preparativas durante la obtención tales como almacenar el precipitado isoeléctrico (refrigerado o congelado), almacenar la harina o las proteínas aisladas reducen la S debido a la formación de agregados.

Las proteínas obtenidas a partir de suero de soja a pH ácido presentan un corrimiento hacia el rojo debido a la mayor exposición de triptofano al solvente por el mayor grado de desnaturalización de estas proteínas. Las proteínas precipitadas con acetona presentan un corrimiento hacia el azul y valores mayores de intensidad de fluorescencia consistente con su mayor grado de desnaturalización y agregación.

Las medidas de hidrofobicidad confirman que las proteínas de suero obtenidas desde un suero de soja con un pH ácido están más desnaturalizadas que las aisladas cuando el pH es alcalino así como el mayor grado de desnaturalización de las proteínas insolubles. Las proteínas de suero aisladas desde suero de soja con el pH alcalino contienen agregados abiertos hidratados estabilizado por interacciones no hidrofóbicas que liberan proteínas hidrofóbicas durante la centrifugación. Por el contrario las proteínas aisladas a partir de suero de soja con el pH ácido (cerca de su pI) contienen agregados cerrados que liberan proteínas hidrofóbicas en condiciones de extrema dilución.

En el ASN los agregados tienen una velocidad de adsorción a la interfase ( $V_a$ ) menor respecto de la fracción soluble sin grandes cambios debidos al tratamiento térmico. Por el contrario en las PSS los agregados tienen  $V_a$  comparables a la fracción soluble y la  $V_a$  aumenta con el tratamiento térmico.

Entre las PSS la muestra PSS<sub>ac-8</sub> fue la menos tensioactiva con bajos valores de  $V_a$  y el valor más alto para la tensión superficial de equilibrio ( $\gamma_e$ ). Por el contrario PSS<sub>am-8</sub> calentada fue la de mejor comportamiento superficial registrando el valor más alto de  $V_a$  y el más bajo de  $\gamma_e$ . En esta última proteína, los agregados mostraron actividad superficial.

# **6. Propiedades emulsionantes de sueros deshidratados y proteínas aisladas**



## ***Emulsiones con sueros y proteínas aisladas***

En este capítulo se estudiarán la formación y estabilidad de emulsiones preparadas con las muestras analizadas previamente siguiendo el orden utilizado en los módulos anteriores.

Se analizarán las emulsiones preparadas con: 1) sueros deshidratados, 2) proteínas aisladas a partir de los sueros líquidos (por ser más nativas y solubles), 3) suero de soja liofilizado calentado hasta 150°C (SSLC 150) en donde los factores antitripticos están inactivados, 4) proteínas aisladas de este suero (PSSLC 150) y finalmente, 5) proteínas tratadas térmicamente en dispersiones acuosas.

Las emulsiones o/w fueron preparadas como se detalló en 2.14.1 empleando cantidades equivalentes de proteína en la fase acuosa. Para ello se pesaron cantidades adecuadas de cada una de las muestras (sueros o proteínas aisladas) necesarias para alcanzar 1, 5 o 10 mg de proteína/g en buffer fosfato 10 mM pH 7,0, agregándose aceite refinado de girasol como fase dispersa ( $\phi_m = 0,33$ ) y realizando la homogeneización con un equipo de baja energía (Ultraturrax T-25). Para los cálculos se emplearon los datos de contenido de proteína en los sueros y en las proteínas aisladas, respectivamente (Tablas 7 y 9).

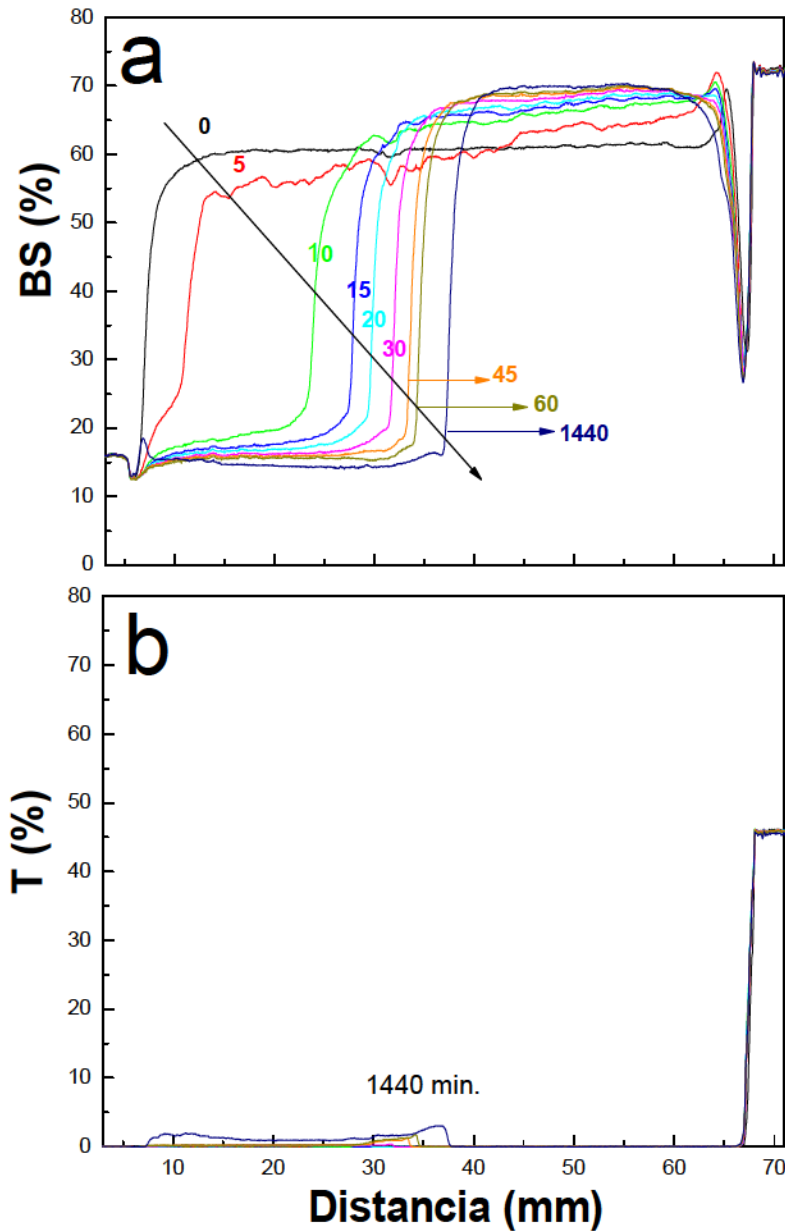
### **6.1 Emulsiones preparadas con sueros deshidratados**

***Desestabilización en condiciones estacionarias:*** La estabilidad de las emulsiones recién preparadas fue cuantificada empleando un analizador óptico vertical (*Quick Scan*, sección 2.14.2.4). Este equipo analiza la desestabilización de una emulsión en condiciones estacionarias realizando barridos a lo largo de la celda en donde se encuentra la emulsión. En la Figura 29a se muestran como ejemplo, los perfiles de Backscattering (BS%) y Transmitancia (T%) en función de la distancia o altura de la celda de una emulsión o/w preparada con STST a una concentración de 5 mg de proteína/ml en la fase acuosa. En ella pueden diferenciarse dos zonas: zona inferior (por debajo de 40 mm) en donde se observa un corrimiento de los perfiles y se analiza la desestabilización por cremado-floculación y una zona superior (por encima de los 40 mm) en donde se acumulan las gotas de fase dispersa que migran debido a la diferencia de densidad y se forma la crema.

En la zona inferior se observa que, para la emulsión recién preparada ( $t=0$ ), el BS% inicial ronda el 60%, mientras que luego de 5 min. de almacenamiento dicho valor baja a  $\approx 55\%$ . Este corrimiento y descenso en los perfiles de BS% con el tiempo de almacenamiento se debe al empobrecimiento de gotas de aceite que migran hacia la zona superior (cremado). Nótese que mientras que el BS% disminuye en la zona inferior por empobrecimiento de

## Emulsiones con sueros y proteínas aisladas

gotas de aceite, en la zona superior el BS% aumenta por acumulación de las mismas, formando lo que se denomina “fase crema”.



**Figura 29:** Perfiles de Quick Scan de una emulsión o/w preparada con de 5 mg proteína/ml de STST. a) BS (%): Backscattering inicial porcentual. b) T (%): Transmitancia porcentual. Distancia: Altura de la celda. Se muestra el perfiles inicial ( $t=0$ ) y los correspondientes a 5, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 y 1440 minutos.

En ocasiones en la base de la fase crema, es posible observar un pico atribuible a la acumulación de gotas pequeñas de aceite que migran con una menor velocidad. En la parte final (zona superior de la crema), para esta muestra en particular, es posible observar un pico más notable para el perfil de 5 minutos (curva roja) que corresponde a espuma

## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

formada durante el proceso de homogeneización. En esta zona superior de la emulsión se produce la acumulación de las gotas de aceite de mayor tamaño, debido a que migran con una mayor velocidad. En algunas emulsiones, en la zona superior de la misma puede observarse una disminución del BS% que indica una reducción en el número de gotas correspondiente con un proceso de coalescencia en el cual las gotas pierden su integridad y forman gotas de mayor tamaño (McClements, 1999).

Cabe mencionar que la coalescencia, puede determinarse en condiciones estacionarias como recién se explicó analizando los perfiles de BS%, que es equivalente a medidas de turbidez (Britten y Giroux, 1991) o empleando la Ec. 12, que utiliza los valores  $D_{4,3}$  y  $D_{4,3ini}$  correspondientes a la emulsión almacenada e inicial respectivamente, obtenidos a partir de las distribuciones de tamaño de partícula (DTP).

En la Figura 29b se muestran los perfiles de T% con valores tan bajos durante la primera hora de almacenamiento que apenas son apreciables. Solo para el perfil de 1440 min. (correspondiente a 24 h) se observa una  $T\% < 3\%$  en el rango 8-38 mm de la celda. Los perfiles T% permiten evaluar una clarificación total de la fase inferior por un proceso de cremado muy avanzado.

A partir de los perfiles en la zona baja del tubo se determinó el Backscattering inicial promedio porcentual [ $BS_{0prom}(\%)$ ], la constante cinética de separación gravitacional (K, Ec. 13) y el porcentaje en volumen de la fase crema luego de 24 h (FC%, Ec. 14) para emulsiones preparadas con SSL, SSST, STL y STST. En la Tabla 35 pueden distinguirse tendencias bien definidas de acuerdo al tipo y a la cantidad de agente emulsificante. Se observa un aumento de los parámetros  $BS_{0prom}(\%)$  y FC% en la medida que se incrementa la cantidad de suero deshidratado utilizado como agente emulsificante.

El  $BS_{0prom}(\%)$  es proporcional a la cantidad de gotas e inversamente proporcional al tamaño de las mismas, razón por la cual altos valores son asociados frecuentemente con una mayor área creada y con la presencia de gotas más chicas (Palazolo y col., 2004). Este parámetro será utilizado con cuidado y solo como una aproximación para estimar el tamaño de gotas debido a que, no permite diferenciar entre gotas y flóculos de tamaño equivalente formados por gotas más chicas o la presencia de distribuciones multimodales. Por lo dicho, el tamaño de las gotas que forman una emulsión así como la estabilidad de la misma será obtenido a partir de las DTP.

El valor de  $BS_{0prom}(\%)$  en las emulsiones SSL y SSST aumenta significativamente con el aumento de la concentración. Si se comparan las emulsiones con concentraciones proteicas equivalentes, los valores de  $BS_{0prom}(\%)$  para estas emulsiones son significativamente

## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

menores a las preparadas con STL o STST, que tienen entre sí valores de  $BS_{0prom}(\%)$  comparables ( $p < 0,05$ ; Tabla 35). Esto indica que el suero de tofu industrial liofilizado o secado por calor, aún cuando sus proteínas son menos solubles que en SSL (sección 5.1), permite la formación de emulsiones más finas y como veremos luego, también más estables independientemente de la concentración.

Los valores de K, independientemente de la muestra empleada, disminuyen a medida que aumenta la cantidad de agente emulsificante utilizado. La disminución de esta constante cinética (Ec. 13) indica un menor grado de desestabilización por cremado (Palazolo y col., 2004), lo cual se corresponde con el aumento de  $BS_{0prom}(\%)$  observado.

**Tabla 35:** Parámetros obtenidos a partir de perfiles de Quick Scan en la zona baja de emulsiones o/w preparadas con 1, 5 o 10 mg proteína/ml de los diferentes sueros deshidratados.  $BS_{0prom}(\%)$ : Backscattering inicial promedio porcentual. K: Constante cinética de separación gravitacional. FC%: Fase crema porcentual formada luego de 24 h.

Muestra	Proteína (mg/ml)	$BS_{0prom}(\%)$	K ( $\text{min}^{-1}$ )	FC%
SSL	1	$37,69 \pm 1,70^a$	$13,29 \pm 0,69^a$	$29,62 \pm 3,35^a$
	5	$48,22 \pm 0,63^b$	$12,42 \pm 0,99^a$	$45,68 \pm 1,99^b$
	10	$52,96 \pm 0,63^c$	$1,57 \pm 0,33^b$	$45,98 \pm 0,42^b$
SSST	1	$31,30 \pm 4,08^d$	$30,62 \pm 0,14^c$	$16,23 \pm 1,84^c$
	5	$44,41 \pm 0,30^e$	$25,75 \pm 4,16^d$	$44,21 \pm 1,93^b$
	10	$48,99 \pm 4,15^{b,c}$	$21,76 \pm 3,9^d$	$46,89 \pm 0,43^b$
STL	1	$55,06 \pm 2,48^{b,c}$	$2,15 \pm 0,45^{b,g}$	$59,83 \pm 6,78^d$
	5	$59,51 \pm 0,77^f$	$1,57 \pm 0,13^b$	$55,14 \pm 2,41^d$
	10	$62,36 \pm 0,75^g$	$0,29 \pm 0,02^e$	$54,63 \pm 0,50^d$
STST	1	$51,00 \pm 2,26^{b,c}$	$7,34 \pm 1,54^f$	$39,05 \pm 4,43^b$
	5	$59,24 \pm 0,74^f$	$2,40 \pm 0,19^g$	$48,84 \pm 2,13^b$
	10	$60,35 \pm 0,78^f$	$1,09 \pm 0,08^h$	$49,88 \pm 0,39^b$

Letras superíndice diferentes indican valores medios significativamente diferentes en una misma columna ( $p < 0,05$ ).

Los valores de K permiten inferir que, para concentraciones equivalentes, las emulsiones SSL y SSST son significativamente menos estables que las preparadas con STL o STST ( $p < 0,05$ ; Tabla 35). Los menores valores de K de las emulsiones preparadas con el suero de tofu respecto al suero de soja indican que con el suero industrial se obtienen emulsiones



## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

con una mayor estabilidad frente al cremado. En particular las emulsiones obtenidas con STL a la menor concentración se caracterizan por su alta estabilidad frente al cremado la cual es comparable a la obtenida con 5 veces la cantidad de STST ( $p < 0,05$ ; Tabla 35).

La mayor estabilidad de las emulsiones preparadas con el suero de tofu industrial podría explicarse en parte por el alto grado de desnaturalización de sus proteínas constitutivas y considerando la presencia de carbohidratos en estas muestras. El parámetro HC-P, que da cuenta de la cantidad de carbohidratos unidos a proteínas, dio para STL y STST valores comparables y tres veces mayores respecto al SSL ( $p < 0,05$ ; Tabla 8). Además, las proteínas en el STL y en mayor grado en el STST tienen un grado de desnaturalización mucho mayor respecto de las proteínas presentes en el SSL, muestra a la cual no se le aplicó tratamiento térmico alguno. El  $\Delta H$  de las proteínas aisladas a partir de ST fue  $< 0,1$  J/g (Tabla 21) mientras que las proteínas del SSL están nativas (Figura 15). El mayor grado de desnaturalización y la presencia de una mayor cantidad de carbohidratos en las proteínas presentes en STL y STST explican la mayor estabilidad de las emulsiones preparadas con estos sueros. Hay numerosos estudios que demuestran que la glicosilación de una proteína con un carbohidrato modifica las propiedades fisicoquímicas de la proteína mejorando la capacidad de formar emulsiones (Fujiwara y col., 1998; Song y col., 2002; Laura y col., 2005; Jing y Nakamura, 2005 y Akhtar y Dickinson, 2007).

Los valores de  $BS_{0prom}(\%)$  en las emulsiones STST o STL, con 1 mg proteína/ml en la fase acuosa, se ubican en el rango 51-55% y disminuyen hasta 31-38% para SSL y SSST ( $p < 0,05$ ; Tabla 35). Si bien a 10 mg/ml los valores  $BS_{0prom}(\%)$  no son significativamente diferentes para SSL y SSST, en el rango 1-5 mg/ml, este parámetro en SSL es significativamente mayor que en SSST. Este resultado puede atribuirse a que en esta última muestra hay una significativa pérdida de solubilidad debido al secado por calor (sección 5.1).

La menor estabilidad esperable en las emulsiones SSST fue confirmada con los valores más altos de K. Los valores de K para SSST son entre 2,1 a 2,3 veces mayores que los de SSL en el rango 1-5 mg/ml respectivamente (Tabla 35). Esta tendencia se acentúa con la concentración siendo la K de la emulsión preparada con 10 mg de SSST  $\approx 14$  veces mayor respecto de la emulsión preparada con SSL, aun cuando los valores de  $BS_{0prom}(\%)$  resultan comparables.

Nótese que aunque  $BS_{0prom}(\%)$  y K indican las mismas tendencias generales, K resulta más sensible y útil para analizar diferencias entre el suero liofilizado y el secado por calor a baja temperatura. Por ejemplo en el rango 5-10 mg/ml para STST, los  $BS_{0prom}(\%)$  resultan

## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

comparables hallándose diferencias significativas entre los valores de  $K$  ( $p < 0,05$ ; Tabla 35). Esto indica que los valores de  $BS_0$  no proveen información suficientemente para poder explicar la estabilidad.

A partir de los valores de  $FC\%$  (Tabla 35) se obtienen los siguientes resultados: i) para un mismo suero, aumentar la cantidad utilizada en la preparación de la emulsión se traduce en la formación de una fase crema de mayor tamaño. Dado que todas las emulsiones tienen la misma cantidad de aceite ( $\phi_m = 0,33$ ) esto indica que las cremas formadas tienen un grado de hidratación mayor, ii) para concentraciones equivalentes, las emulsiones preparadas con SSL o SSST forman cremas menos hidratadas respecto a STL o STST, iii) el secado térmico del suero reduce la cantidad de fase crema y el grado de hidratación de las cremas obtenidas para ambos tipos de sueros.

En todo el rango de concentraciones las cremas formadas en las emulsiones STST son significativamente menos hidratadas (referencia STL). El alto grado de hidratación de la crema formada en la emulsión con la menor cantidad de STL indica la formación de flóculos hidratados que forman una red abierta capaz de retener gotas de agua. Mientras que a 1 mg/ml el grado de hidratación de la crema de SSST es significativamente menor respecto al de SSL resulta comparable a las otras concentraciones ( $p < 0,05$ ; Tabla 35).

El mayor grado de hidratación de las cremas formadas a partir de las emulsiones preparadas con STL o STST puede explicarse en base a la formación de flóculos estables, los cuales pueden formar una estructura tipo red capaz de retener agua así como a la formación de multicapas proteicas que hidratan el film interfacial que rodea las gotas de fase dispersa.

***Índice de actividad emulsificante:*** El área creada para las emulsiones recién preparadas con los sueros deshidratados (con concentración proteica 5 mg/ml) fue estimada empleando el índice de actividad emulsificante (IAE). Dicho índice fue definido mediante la Ec. 7; los valores particulares de los IAE se encuentran en la Tabla 36.

Con o sin SDS el área creada disminuye siguiendo el orden:  $STST \geq STL \geq SSL > SSST$ .

Donde  $>$  y  $\geq$  son usados para indicar que las diferencias entre los valores alcanzan o no para que sean significativas respectivamente. Este orden indica que la emulsión obtenida con SSST es la de menor área interfacial creada, que explica la baja estabilidad al cremado observada (Tabla 35).

## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

Para el caso de la emulsión preparada con STL, en ausencia de SDS, los valores de IAE son significativamente menores respecto a los medidos con SDS ( $p < 0,05$ ; Tabla 36). Este resultado indica la presencia de flóculos mediados por interacciones proteína-proteína formados por el mecanismo de puenteo (Thanasukarn y col, 2004a). La alta estabilidad al cremado está básicamente justificada por el bajo tamaño de gotas (alto IAE con SDS), pero la presencia de flóculos podría aportar una estabilidad adicional. Los flóculos si son hidratados pueden tener una densidad próxima a la de la fase dispersante y además, formar una fase crema con un alto grado de hidratación (Tabla 35). La existencia de este tipo de flóculos impide la compactación de las gotas durante el cremado.

**Tabla 36:** Índice de actividad emulsificante (IAE) determinado con y sin SDS sobre emulsiones o/w ( $\phi_m$ : 0,33) preparadas con 5 mg proteína/ml de los diferentes sueros deshidratados.

Muestra	IAE ( $m^2/g$ )	
	SDS	
	Si	No
SSL	$20,31 \pm 3,25$ <sup>a</sup> <sub>1</sub>	$18,36 \pm 1,84$ <sup>a</sup> <sub>1</sub>
SSST	$6,91 \pm 1,23$ <sup>b</sup> <sub>1</sub>	$6,25 \pm 1,44$ <sup>b</sup> <sub>1</sub>
STL	$27,72 \pm 4,16$ <sup>a,c</sup> <sub>1</sub>	$19,09 \pm 2,71$ <sup>a</sup> <sub>2</sub>
STST	$36,12 \pm 4,83$ <sup>c</sup> <sub>1</sub>	$25,25 \pm 7,27$ <sup>a</sup> <sub>1</sub>

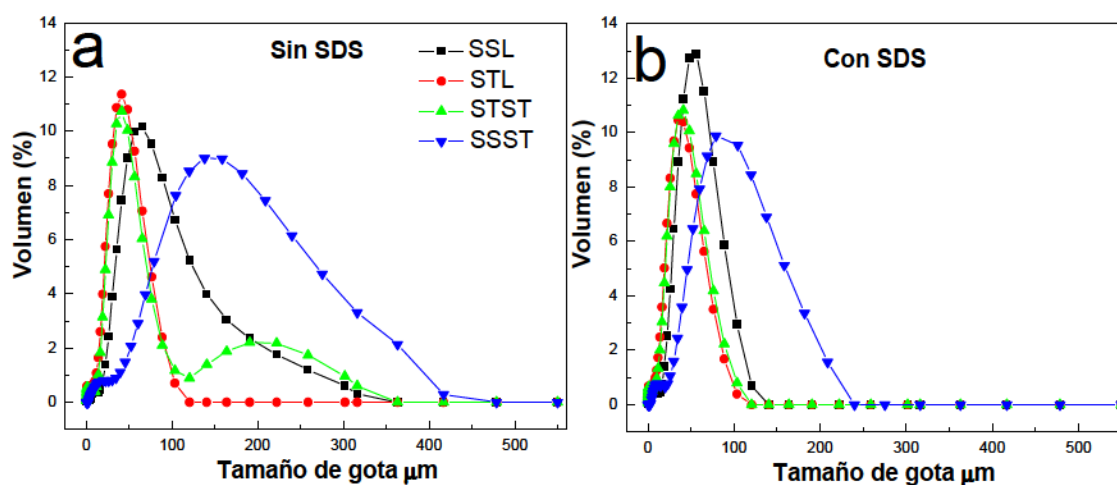
Letras superíndice diferentes indican valores medios significativamente diferentes en una misma columna; números subíndice diferentes en una misma fila indican valores medios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Por el contrario el IAE de la emulsión preparada con SSST con o sin SDS es prácticamente similar lo que indicaría la ausencia de flóculos estables en las condiciones del ensayo (alta dilución en solución sin SDS con agitación suave). La ausencia de flóculos se correlaciona perfectamente con la tan baja hidratación de la fase crema (Tabla 35).

**Distribución de tamaño de partícula:** Las distribuciones de tamaño de partícula (DTP) de las emulsiones preparadas con los sueros a una concentración proteica en la fase acuosa de 5 mg/ml (concentración media entre las usadas para los ensayos de estabilidad), fueron determinadas como se detalló en la sección 2.14.2.2 y se muestran en la Figura 30. Nótese que, en presencia de SDS, las distribuciones de partículas se corren hacia tamaños de gotas menores respecto a los hallados en ausencia de SDS. Este comportamiento se debe a la ruptura de flóculos debidas al detergente.

## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

Las distribuciones de partículas en presencia de SDS (Figura 30b) adoptan formas similares para las emulsiones preparadas con STL, STST y SSL con máximos ubicado en el rango 30-35  $\mu\text{m}$  para las dos primeras y a 45  $\mu\text{m}$  para la última, indicando un comportamiento similar para las emulsiones preparadas con STL y STST y un tamaño de gota mayor para la emulsión preparada con SSL.



**Figura 30:** Distribución de tamaño de partícula (DTP) de emulsiones o/w preparadas con 5 mg proteína/ml de los diferentes sueros deshidratados. a) Sin SDS. b) Con en SDS.

En las mismas condiciones, la DTP para el SSST es mucho más ancha indicando una mayor variación en el tamaño de las gotas (mayor polidispersidad) y su máximo está notablemente desplazado hacia tamaños de gota mayores; las gotas para esta emulsión son 2-3 veces más grandes que las obtenidas con los otros sueros.

Las DTP sin SDS (Figura 30a) en ocasiones son bimodales, comportamiento que puede atribuirse tanto a las condiciones de preparación como a la presencia de flóculos estables en las condiciones de medida. La DTP que con o sin SDS presenta las menores diferencias corresponde a la emulsión preparada con STL que continúa siendo monomodal y su máximo se desplaza en  $\approx 3 \mu\text{m}$  y es en consecuencia, la emulsión menos floculada. Le sigue la emulsión preparada con STST en la cual, en ausencia de SDS, presenta una segunda población con un máximo  $\approx 200 \mu\text{m}$  debido a la presencia de flóculos estables en las condiciones de medida que desplaza el máximo de la distribución en  $\approx 20 \mu\text{m}$ .



## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

Finalmente las DTP para SSL y en mayor medida SSST son las emulsiones más floculadas con DTP más anchas por lo que la ubicación de los máximos se desplaza en 33 y 81  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

Se debe notar que, la emulsión más floculada determinada a partir de los  $D_{4,3}$  de las DTP con o sin SDS corresponde a la emulsión preparada con SSST (Tabla 37), y que este resultado es opuesto a lo esperado en base a los valores significativamente menores de IAE con y sin SDS (Tabla 36) y al bajo grado de hidratación de la crema formada (Tabla 35) en las emulsiones preparadas con esta muestra. Las diferencias pueden atribuirse a la forma en que se procesa la emulsión para realizar las diferentes medidas y a la información que proveen los diferentes parámetros obtenidos.

Por un lado, el IAE consiste en medidas de turbidez que no son muy sensibles a la presencia de flóculos y para detectar la presencia de estos se emplea una muy alta dilución y agitación suave pero suficiente para que muchos flóculos se desarmen o coalescan. Por otro lado, la obtención de la DTP se realiza a una concentración de 5 mg/ml, en la cual la estabilidad de los flóculos es mayor. La dilución en el equipo de dispersión se realiza con una alta dilución en agua y con agitación vigorosa (2000 rpm), condiciones en las que solo permanecen los flóculos estables. Pero lo que más diferencia a este método con el de IAE, es que para el cálculo del grado de floclación se utiliza el parámetro  $D_{4,3}$  que es proporcional al volumen ocupado por las gotas, razón por la cual las gotas de mayor tamaño o los flóculos que resisten las condiciones de medida tienen más peso respecto a las gotas de menor tamaño.

Los valores de  $D_{4,3}$  con y sin SDS y el grado de floclación inicial ( $GF_i\%$ ) calculado a partir ellos con la Ec. 11 se muestran en la Tabla 37, datos que permiten cuantificar las tendencias mostradas en la Figura 30.

El STL es el mejor agente emulsificante ya que permite la formación de emulsiones que, en ausencia de SDS, tiene un valor de  $D_{4,3}$  significativamente menor respecto de los demás sueros ( $p < 0,05$ ; Tabla 37). El menor valor de  $D_{4,3}$  hallado en las emulsiones preparadas con STL indica que las emulsiones están formadas por gotas de menor tamaño y son por lo tanto más estables. Le siguen con un tamaño de gota mayor y consecuentemente una menor estabilidad las emulsiones preparadas con STST.

El menor tamaño de gota ya había sido estimado previamente a partir de los mayores valores de  $BS_{0prom}(\%)$  que presentan las emulsiones preparadas con STL y STST, las cuales además exhiben los valores más altos de IAE confirmando la presencia de una mayor cantidad de gotas de menor tamaño debido a la estabilización de una mayor área

## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

interfacial. La mayor estabilidad de estas emulsiones queda confirmada por los menores valores de K, significativamente menor respecto a concentraciones equivalente de los demás sueros.

**Tabla 37:** D<sub>4,3</sub>: Diámetros promedio de Brouker obtenidos a partir de las DTP de la Figura 30 preparadas con 5 mg proteína/ml de los diferentes sueros deshidratados. GF<sub>i</sub>: Grado de floculación inicial.

Muestra	D <sub>4,3</sub> ( $\mu\text{m}$ )		GF <sub>i</sub> (%)
	SDS		
	Si	No	
SSL	45,54 $\pm$ 2,10 <sup>a</sup> <sub>1</sub>	70,58 $\pm$ 2,59 <sup>a</sup> <sub>2</sub>	55,0 $\pm$ 2,5 <sup>a</sup>
SSST	92,30 $\pm$ 1,71 <sup>d</sup> <sub>1</sub>	172,62 $\pm$ 29,52 <sup>c</sup> <sub>2</sub>	87,0 $\pm$ 3,6 <sup>b</sup>
STL	31,99 $\pm$ 0,98 <sup>c</sup> <sub>1</sub>	35,41 $\pm$ 1,12 <sup>d</sup> <sub>2</sub>	10,7 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup>
STST	34,07 $\pm$ 0,58 <sup>b,c</sup> <sub>1</sub>	52,97 $\pm$ 2,23 <sup>b</sup> <sub>2</sub>	55,5 $\pm$ 2,6 <sup>d</sup>

Letras superíndice diferentes indican valores medios significativamente diferentes en una misma columna; números subíndice diferentes en una misma fila indican valores medios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Respecto a STL, la emulsión obtenida con STST tiene un valor de D<sub>4,3</sub> con SDS (gotas individuales) comparable pero significativamente mayor en su ausencia (con flóculos), lo que indica la existencia de una mayor cantidad de flóculos. El GF<sub>i</sub> para la emulsión STST es 5 veces mayor respecto a STL ( $p < 0,05$ ; Tabla 37). Los resultados muestran que, el tratamiento térmico adicional aplicado al ST para su secado mejora las interacciones proteína-proteína aumentando la cantidad de flóculos formados.

Aunque el tratamiento térmico tiene un efecto positivo respecto a la formación de flóculos su efecto es negativo para la estabilidad. Si bien hay un aumento del GF<sub>i</sub>, los flóculos obtenidos ven reducida su estabilidad, lo que se evidencia por la reducción significativa en el grado de hidratación de la fase crema en todo el rango de concentraciones ( $p < 0,05$ ; Tablas 35 y 37).

Lo dicho en el párrafo anterior se apoya en estudios adicionales sobre emulsiones obtenidas con el suero industrial. Se realizó la determinación de la DTP tras un almacenamiento estacionario a temperatura ambiente (8 h) determinándose el grado de floculación (GF%) y el grado de coalescencia (GC%) empleando las Ec. 10 y 12, respectivamente. Luego de dicho almacenamiento las emulsiones preparadas con STL presentaron valores de D<sub>4,3</sub> con o sin SDS algo mayores ubicados entre 37,1-37,3  $\mu\text{m}$ , dando un GF y un GC de 0,3 y 16,1% respectivamente, indicando que los flóculos presentes en la emulsión inicial se desestabilizan por coalescencia. Un comportamiento

## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

similar fue observado luego de almacenar las emulsiones preparadas con STST a temperatura ambiente también durante 8 h, en este caso el GFi se redujo de 55,5% (Tabla 37) hasta 12,2% dando un GC de 37,9% confirmando una mayor tendencia a la coalescencia debido al tratamiento térmico de esta muestra.

De manera equivalente a lo visto con el suero industrial, el secado térmico del SS es el responsable del aumento significativo hallado en el SSST tanto en el  $D_{4,3}$  como en el GFi ( $p < 0,05$ ; Tabla 37), obteniéndose la emulsión que tiene las gotas más grandes, la más floculada y por lo tanto la menos estable.

La presencia de gotas de mayor tamaño para SSL y SSST corroboran los hallazgos de la sección anterior donde la presencia de gotas grandes fue anticipada con los menores valores de  $BS_{0prom}(\%)$  e IAE mientras que la menor estabilidad quedó establecida por los valores significativamente más altos de K y el menor grado de hidratación de las cremas ( $p < 0,05$ ; Tabla 35). En el rango 1-10 mg/ml las K de las emulsiones preparadas con SSST resultaron significativamente mayores respecto a cantidades equivalentes de SSL, indicando que con SSST se obtienen emulsiones menos estables al cremado. Este resultado junto al elevado GFi (Tabla 37) de las emulsiones con SSST indica que los flóculos son incapaces de retrasar la floculación y dan cuenta de la baja estabilidad de la emulsión.

Luego de un almacenamiento a temperatura ambiente de 8 h, las emulsiones preparadas con 5 mg proteína/ml de SSL registraron un aumento del  $D_{4,3}$  en ausencia de SDS de 70,6 (Tabla 37) a 106,5  $\mu\text{m}$ . Mientras que las emulsiones preparadas con SSST tuvieron una estabilidad tan baja que, luego del almacenamiento estacionario se desestabilizaron por coalescencia a tal punto que no fue posible tomar una muestra representativa para determinar la DTP.

La baja estabilidad de las emulsiones preparadas con SSST también se encuentra cuando las medidas se realizan en condiciones de agitación ya que las emulsiones se desestabilizan por coalescencia en gotas de mayor tamaño dando los valores más altos de  $D_{4,3}$  ( $p < 0,05$ ; Tabla 37).

La mayor reducción en la capacidad emulsionante del SSST respecto al SSL comparado con el STST en relación al STL puede atribuirse a diferentes factores. Por un lado la significativa reducción en la solubilidad de las proteínas. La solubilidad de las proteínas en el SSST es significativamente menor respecto al SSL, mientras que entre STST y STL las solubilidades son comparables ( $p < 0,05$ ; Tabla 25).

## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

**Aceite separado:** El aceite separado (AS%) fue determinado como se detalló en 2.14.2.5 para emulsiones con los tres niveles de concentración proteica. Los resultados se presentan en la Tabla 38. Para todos los sueros excepto SSST el aumento de la concentración se traduce en la formación de emulsiones más estables que liberan una menor cantidad de aceite. Las emulsiones preparadas con la menor concentración de cualquiera de los sueros liberan cantidades de aceite en el rango de 6-7%. Un aumento de 10 veces en la cantidad de SSL, STL o STST utilizado aumenta la estabilidad de la emulsión y reduce la cantidad de AS% hasta valores comprendidos entre 0,7-1,8%.

**Tabla 38:** Aceite separado porcentual (AS%) de emulsiones o/w preparadas con 1, 5 o 10 mg proteína/ml de los diferentes sueros deshidratados.

Muestra	AS (%)		
	Concentración (mg proteína/ml de fase acuosa)		
	1	5	10
SSL	7,02 ± 0,16 <sup>a</sup> <sub>1</sub>	3,29 ± 0,74 <sup>a</sup> <sub>2</sub>	1,81 ± 0,22 <sup>a</sup> <sub>3</sub>
SSST	6,27 ± 0,97 <sup>a,b</sup> <sub>1</sub>	7,23 ± 1,45 <sup>b</sup> <sub>1</sub>	13,61 ± 2,10 <sup>b</sup> <sub>2</sub>
STL	6,53 ± 0,07 <sup>b</sup> <sub>1</sub>	1,71 ± 0,03 <sup>c</sup> <sub>2</sub>	1,23 ± 0,14 <sup>c</sup> <sub>3</sub>
STST	6,13 ± 0,71 <sup>b</sup> <sub>1</sub>	1,34 ± 0,04 <sup>d</sup> <sub>2</sub>	0,71 ± 0,01 <sup>d</sup> <sub>3</sub>

Letras superíndice diferentes indican valores medios significativamente diferentes en una misma columna; números subíndices diferentes en una misma fila indican valores medios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Por el contrario, el AS% aumenta con la concentración de SSST, duplicándose al pasar de 1 a 10 mg/ml. Este comportamiento puede atribuirse a la alta tendencia que tiene esta muestra en formar emulsiones que se desestabilizan por coalescencia en condiciones de agitación y a que, como es sabido, la coalescencia frecuentemente es el paso previo que conduce a la separación de aceite libre (McClements, 1999).

La menor capacidad de retener aceite en las emulsiones preparadas con SSL o SSST es esperable debido que se trata de emulsiones inicialmente floculadas formadas por gotas grandes las cuales se desestabilizan y forman cremas con un bajo porcentaje de hidratación que facilita la desestabilización por coalescencia y la liberación de aceite.

## **6.2 Emulsiones preparadas con proteínas aisladas**

A continuación se analizarán las emulsiones preparadas con proteínas aisladas a partir de sueros líquidos, tomando como referencia las emulsiones obtenidas con ASN. Se van a



## ***Emulsiones con sueros y proteínas aisladas***

comparar también con emulsiones preparadas con los sueros deshidratados. Las proteínas de suero utilizadas son representativas de las características de composición, solubilidad y propiedades fisicoquímicas vistas:  $PST_{ac-5,5}$  por tratarse de una proteína totalmente desnaturalizada, aislada de un suero industrial que contiene calcio; proteínas obtenidas a partir de SS a pH 4,5, aisladas por acetona y por *salting out*. Estas últimas fueron seleccionadas para la preparación de emulsiones debido a: i) a su mayor grado de desnaturalización respecto a las obtenidas desde un SS alcalino (sección 4.2.2.1), ii) su mayor exposición de los grupos Trp al solvente (sección 5.7.1) y además iii) por sus valores más altos de  $H_0$  (sección 5.7.2), por lo que se espera tengan un mejor comportamiento en la formación y estabilización de emulsiones.

***Desestabilización en condiciones estacionarias e índice de actividad emulsificante:*** El estudio de las emulsiones con proteínas aisladas se llevó a cabo de manera similar al realizado con los sueros deshidratados. A fin de poder comparar las emulsiones preparadas con los sueros deshidratados y las obtenidas con proteínas aisladas y evaluar el efecto ejercido por los componentes no proteicos presentes en los sueros, las emulsiones fueron preparadas de forma idéntica utilizando las mismas concentraciones de proteína en la fase acuosa (1, 5 o 10 mg proteína/ml) que las utilizadas con los sueros deshidratados.

Cabe mencionar que, cuando las proteínas aisladas son utilizadas como agentes emulsificantes, estas no solo disminuyen la tensión de equilibrio interfacial sino que imparten al film formado propiedades dinámicas y reológicas que aumentan la resistencia al estrés tangencial (Lucassen-Reynders, 1993).

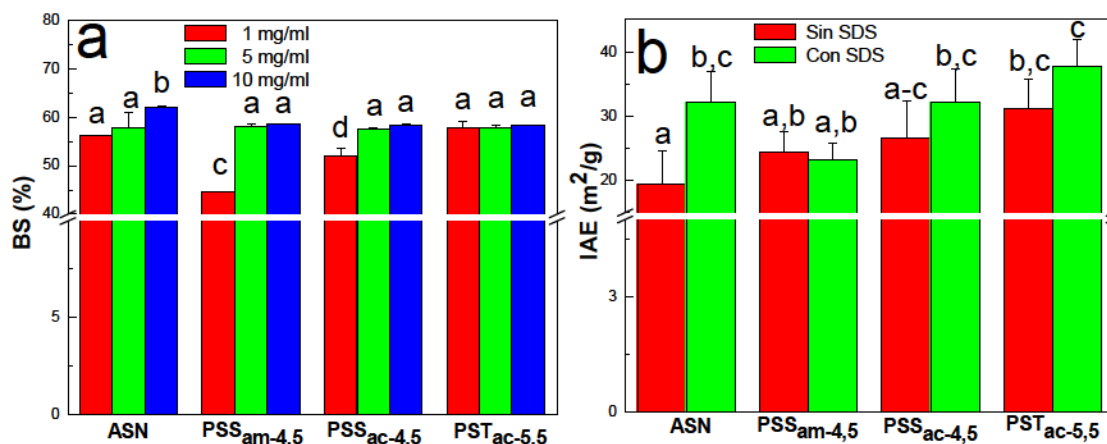
La desestabilización de estas emulsiones recién preparadas con las proteínas aisladas fue analizada empleando el *Quick Scan* obteniéndose perfiles equivalentes a los de la Figura 29. A partir de estos perfiles se obtuvo el  $BS_{0prom}(\%)$  y de forma independiente el IAE, para obtener información del área interfacial creada. Estos parámetros se muestran en la Figura 31.

En la Figura 31a se observa para la menor concentración, que el  $BS_{0prom}(\%)$  de ASN es significativamente mayor respecto a las emulsiones preparadas con proteínas aisladas desde SS pero comparable con las de  $PST_{ac-5,5}$ . Sin embargo, empleando 5 o 10 mg proteína/ml, todas las proteínas aisladas presentan valores de  $BS_{0prom}(\%)$  comparables.

Se debe notar que los valores de  $BS_{0prom}(\%)$  hallados entre todas las PSS y el ASN a 5 mg/ml resultan comparables y que lo mismo sucede cuando se analizan los valores de IAE de emulsiones equivalentes en ausencia de SDS -condiciones en las que se mide el

## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

BS<sub>0prom</sub>(%)- (Figura 31). Dado que el IAE es proporcional al área interfacial creada durante el proceso de homogeneización, se puede inferir que las emulsiones preparadas con las diferentes PSS y el ASN estarían formadas por gotas de tamaños equivalentes. Estos resultados son comparables con los informados por Mitidieri y Wagner (2002), que obtuvieron valores de IAE comparables entre ASN y PSS<sub>am</sub> preparando las emulsiones con un homogenizador similar (Ultraturax T-25) y utilizando 1 mg proteína/ml de fase acuosa.



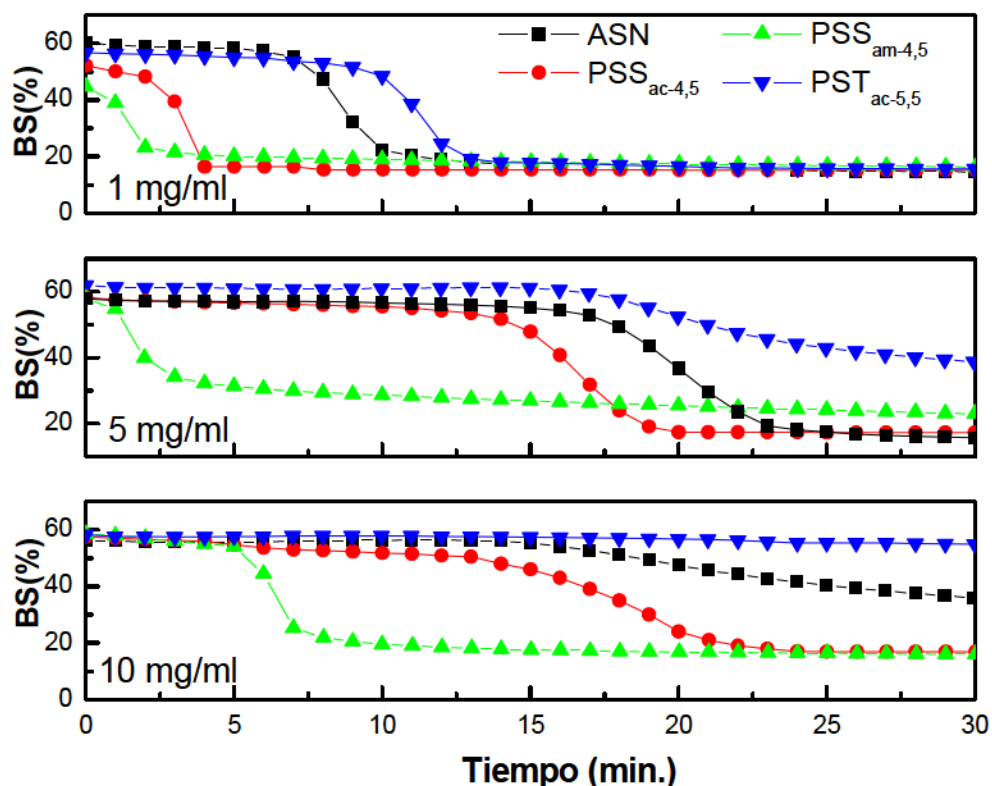
**Figura 31:** a) BS (%): Backscattering inicial porcentual de emulsiones o/w preparadas con 1, 5 o 10 mg proteína/ml de las proteínas aisladas. b) Índice de actividad emulsificante (IAE) determinada con o sin SDS sobre emulsiones preparadas con 5 mg proteína/ml de las proteínas aisladas. Letras diferentes sobre las barras indican valores medios significativamente diferentes entre muestras ( $p < 0,05$ ).

La estabilidad de estas emulsiones es evaluada a partir de las cinéticas de separación gravitacional (cremado) en la parte baja de la emulsión en función del tiempo de almacenamiento estacionario (Figura 32). En estos gráficos se analiza el tiempo que demora el BS<sub>0prom</sub>(%) en disminuir debido al cremado. De esta forma, las emulsiones que requieran más tiempo para comenzar a disminuir el BS<sub>0prom</sub>(%) serán más estables al cremado.

En todo el rango de concentraciones analizadas, la estabilidad al cremado de las emulsiones disminuye siguiendo el orden: PST<sub>ac-5,5</sub> > ASN > PSS<sub>ac-4,5</sub> > PSS<sub>am-4,5</sub>. Como es de esperar, la desestabilización es más rápida empleando 1 mg proteína/ml de fase acuosa (Figura 32a) en donde los valores de BS<sub>0prom</sub>(%) alcanzan un valor mínimo para las cuatro muestras antes de los 15 min. Los valores de K hallados para dicha concentración son:  $1,56 \pm 0,08$ ;  $3,22 \pm 0,78$ ;  $5,36 \pm 0,27$  y  $8,70 \pm 0,28 \text{ min.}^{-1}$  para PST<sub>ac-5,5</sub>, ASN, PSS<sub>ac-4,5</sub> y PSS<sub>am-4,5</sub> respectivamente.

## Emulsiones con sueros y proteínas aisladas

Los valores de K correspondientes a STL y SSL eran  $2,15 \pm 0,45$  y  $13,29 \pm 0,69 \text{ min}^{-1}$  respectivamente (Tabla 35), indicando la mayor estabilidad frente al cremado al utilizar las proteínas aisladas.



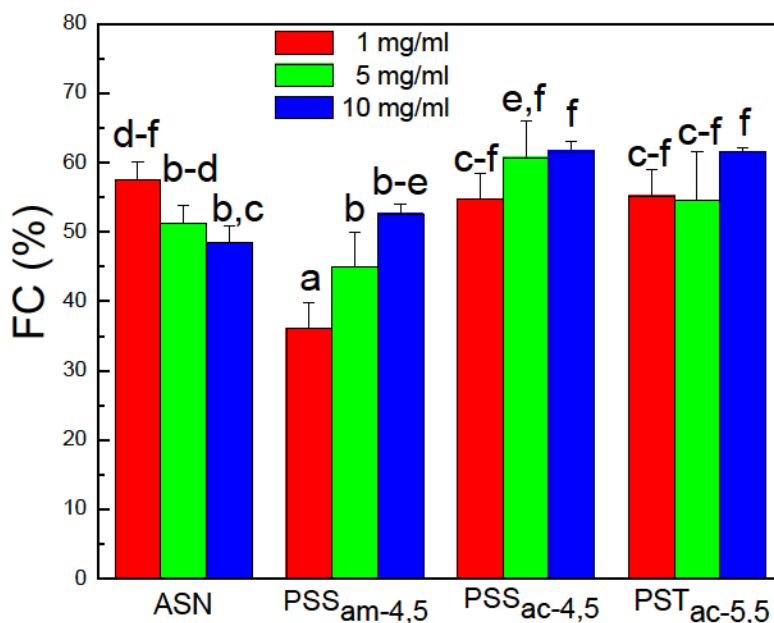
**Figura 32:** Cinéticas de separación gravitacional (cremado) de emulsiones o/w preparadas con proteínas aisladas. a), b) y c) corresponden a 1, 5 o 10 mg de proteína/ml de fase acuosa respectivamente. Se graficaron los valores medios de Backscattering inicial porcentual (BS%) en la zona baja de la emulsión (15-17 mm) en función del tiempo de almacenamiento estacionario.

Nótese que las cinéticas de separación gravitacional proveen información sobre la velocidad con que migran las gotas en la zona inferior de la emulsión y consecuentemente sobre la estabilidad al cremado inmediatamente después que la emulsión es formada. Sin embargo esto no necesariamente correlaciona con la estabilidad de la emulsión a tiempos más largos. Por ejemplo, una emulsión puede tener una alta velocidad de cremado y adquirir estabilidad mediante la formación de una fase crema con un elevado grado de hidratación. Los porcentajes de fase crema (FC%) luego de 24 h de almacenamiento estacionario se muestran en la Figura 33.

A la menor concentración PSS<sub>am-4,5</sub> forma la crema menos hidratada entre todas las proteínas y entre 1-10 mg/ml la crema formada con PSS<sub>ac-4,5</sub> resulta significativamente más hidratada respecto a iguales concentraciones de PSS<sub>am-4,5</sub> ( $p < 0,05$ ; Figura 33). Este

## Emulsiones con sueros y proteínas aisladas

comportamiento no puede explicarse en base a la solubilidad ya que ambas muestras presentan valores comparables (Tabla 32). El mayor grado de hidratación de la crema formada con PSS<sub>ac-4,5</sub> puede atribuirse a la presencia de una mayor cantidad de flóculos hidratados. La presencia de flóculos en las emulsiones preparadas con PSS<sub>ac-4,5</sub> quedó evidenciada por la mayor diferencia entre los IAE con y sin SDS (Figura 31).



**Figura 33:** Fase crema porcentual (FC%) de emulsiones o/w obtenidas con las concentraciones proteína/ml indicadas. Letras o intervalos de letras sobre las barras indican valores medios significativamente diferentes entre muestras ( $p < 0,05$ ).

Adicionalmente, en las proteínas de suero de soja y tofu se observa un aumento del grado de hidratación de la crema en la medida que se aumenta la cantidad de proteína utilizada en preparar la emulsión observándose una tendencia opuesta con ASN.

Una comparación entre el grado de hidratación de las cremas formadas a partir de emulsiones preparadas con las proteínas aisladas o los sueros liofilizados correspondientes (SSL y STL) permite ver que, el grado de hidratación resulta comparable entre STL y PST<sub>ac-5,5</sub> pero diferente entre SSL y PSS<sub>am-4,5</sub> o PSS<sub>ac-4,5</sub>. En el rango 1-10 mg proteína/ml las FC% se ubican entre 55-60% para STL o PST<sub>ac-5,5</sub> (Tabla 35 y Figura 33) lo cual sugiere que los componentes no proteicos del STL no modifican el grado de hidratación de la fase crema o que su efecto quedó compensado por los cambios que experimentados por la proteína durante al aislamiento.

Por el contrario, en el rango 1-10 mg proteína/ml el SSL forma emulsiones con una FC% en el rango 30-46% para SSL (Tabla 35) menor aunque solapado en parte al obtenido con



## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

PSS<sub>am-4,5</sub> (entre 36 y 52%) y mucho menor que el correspondiente a PSS<sub>ac-4,5</sub> (entre 55 y 62%) mostrado en la Figura 33.

El aumento del grado de hidratación hallado para PSS<sub>am-4,5</sub> y en mayor medida para PSS<sub>ac-4,5</sub> respecto de SSL sugiere que los componentes no proteicos del SSL (principalmente oligosacáridos) reducen el grado de hidratación de las cremas. Cabe mencionar que el grado de hidratación de la fase crema formada depende, entre otros factores, de la capacidad que tenga la proteína ubicada en la interfase de interaccionar con el agua. La presencia de azúcares libres podría disminuir la capacidad que tiene la proteína de ligar agua ya que reduce la cantidad de agua disponible (debido a que los azúcares ligan agua) y además los azúcares interaccionan o apantallan a los sitios hidrofílicos sobre la superficie de la proteína.

En forma comparativa PSS<sub>ac-4,5</sub> forma una crema más hidratada (referencia PSS<sub>am-4,5</sub>) en todo el rango de concentración, lo que se debe a la mayor capacidad que tiene esta proteína de interaccionar con el agua. En 5.7.1 se demostró que PSS<sub>ac-4,5</sub> esta más desplegada y posee una mayor exposición de los grupos Trp lo cual explicó los valores de fluorescencia intrínseca 1,6 veces mayores de PSS<sub>ac-4,5</sub> respecto a PSS<sub>am-4,5</sub> (Tabla 33).

***Distribución de tamaño de partícula:*** A partir de las DTP de emulsiones preparadas con 5 mg proteína/ml de fase acuosa se obtuvieron los valores de  $D_{4,3}$  con y sin SDS, dichos valores se presentan en la Tabla 39.

Si se compara con ASN, las emulsiones preparadas con PSS<sub>am-4,5</sub> están formadas por gotas significativamente más grandes ( $p < 0,05$ ; Tabla 39). Mitidieri y Wagner (2002) trabajando con emulsiones equivalente informaron tamaños de gota de  $24,4 \pm 0,8$  y  $28,0 \pm 1,3$   $\mu\text{m}$  para ASN y PSS<sub>am</sub> respectivamente.

Los valores más altos de  $D_{4,3}$  en ausencia o presencia de SDS corresponden a la emulsión preparada con PSS<sub>am-4,5</sub>, le sigue con valores significativamente menores las emulsiones preparadas con PSS<sub>ac-4,5</sub>, siendo la emulsión preparada con PST<sub>ac-5,5</sub> la que exhibe el valor significativamente más bajo de  $D_{4,3}$  ( $p < 0,05$ ; Tabla 39). Estos resultados se corresponden con la estimación del tamaño de gota realizada a partir de las medidas de IAE (Figura 31b). Estos tamaños de gotas explican las cinéticas de cremado (Figura 32) y los valores de K. Las emulsiones preparadas con PSS<sub>am-4,5</sub> que tienen las gotas más grandes, creman con la mayor velocidad y presentan los valores más altos de K, mientras que las preparadas con PST<sub>ac-5,5</sub> están formadas por las gotas más chicas y tienen la menor tendencia a cremar. En tanto que, las emulsiones preparadas con PSS<sub>ac-4,5</sub> y ASN, con tamaños de gotas

## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

comparables e intermedios se desestabilizan con velocidades comprendidas entre las halladas para PST<sub>ac-5,5</sub> y PSS<sub>am-4,5</sub>.

Los mayores valores de D<sub>4,3</sub> en ausencia de SDS dan cuenta de la existencia de flóculos y permiten calcular los GF<sub>i</sub>% que se muestran en la Tabla 39. Puede verse que las emulsiones preparadas con las proteínas aisladas tienen GF<sub>i</sub> significativamente menores (GF<sub>i</sub>: 0,6-9%) respecto a las emulsiones preparadas con los sueros deshidratados correspondientes (GF<sub>i</sub>: 11-87%; Tabla 37). Esto sugiere que, los componentes no proteicos presentes en los sueros de soja deshidratados favorecen la formación de flóculos.

**Tabla 39:** Parámetros obtenidos a partir de emulsiones o/w preparadas con 5 mg proteína/ml de las proteínas aisladas. Las abreviaturas son las de la Tabla 37.

Muestra	D <sub>4,3</sub> ( $\mu\text{m}$ )		GF <sub>i</sub> (%)
	SDS		
	Si	No	
ASN	38,87 $\pm$ 1,17 <sup>a</sup>	40,26 $\pm$ 1,21 <sup>a</sup>	3,6 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
PSS <sub>am-4,5</sub>	46,32 $\pm$ 1,26 <sup>b</sup>	47,05 $\pm$ 1,22 <sup>b</sup>	1,6 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>
PSS <sub>ac-4,5</sub>	39,40 $\pm$ 1,18 <sup>a</sup>	39,64 $\pm$ 1,19 <sup>a</sup>	0,6 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>
PST <sub>ac-5,5</sub>	33,98 $\pm$ 1,02 <sup>c</sup>	37,11 $\pm$ 1,11 <sup>c</sup>	9,2 $\pm$ 0,3 <sup>d</sup>

Letras superíndice diferentes indican valores medios significativamente diferentes en una misma columna ( $p < 0,05$ ).

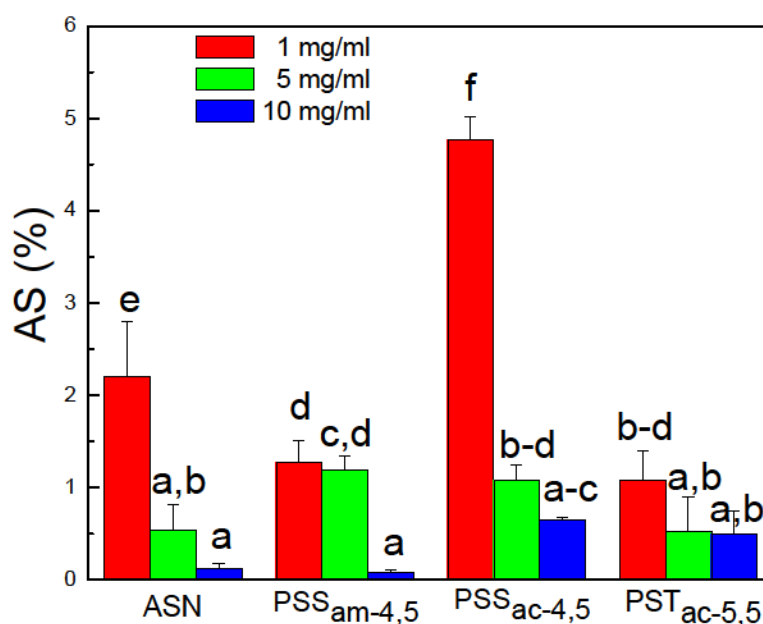
El almacenamiento de estas emulsiones en condiciones estacionarias a temperatura ambiente durante 8 h produjo solo un ligero aumento en los valores de D<sub>4,3</sub> (1-2  $\mu\text{m}$ ) y del GF%. Los D<sub>4,3</sub> con y sin SDS hallados tras el almacenamiento se ubicaron entre 39,3-40,2 y 32,9-36,0  $\mu\text{m}$  para PSS<sub>ac-4,5</sub> y PST<sub>ac-5,5</sub> respectivamente. El GF tras el almacenamiento aumentó de 9,2 a 9,6 para PST<sub>ac-5,5</sub> y de 0,6 a 2,3 para PSS<sub>ac-4,5</sub>.

**Aceite separado:** El aceite liberado por estas emulsiones se muestra en la Figura 34. De forma equivalente a lo visto con los sueros deshidratados hay una reducción en la cantidad de AS% a medida que aumenta la cantidad de proteína utilizada en la emulsión. Este efecto es bien marcado en el caso de las emulsiones preparadas con PSS<sub>ac-4,5</sub> y ASN. Para esta última la cantidad de aceite separado se reduce en 4,1 y 4,4 veces al incrementarse la concentración de 1 a 5 y de 5 a 10 mg/ml respectivamente.

Las emulsiones obtenidas con las proteínas aisladas de sueros separan una cantidad de aceite menor respecto a las emulsiones preparadas directamente con los sueros enteros. Con concentraciones intermedias de los sueros deshidratados como agentes emulsificantes

## Emulsiones con sueros y proteínas aisladas

se obtienen emulsiones que separan entre 1,3-7,2% de aceite (Tabla 38). Mientras que con proteínas aisladas en el mismo rango de concentración, la cantidad de AS% se ubica por debajo de 1,2%. Los valores de AS% utilizando proteínas aisladas, resultan comparables en el rango 5-10 mg proteína/ml para las 4 proteínas analizadas y solo se hallan diferencias a la menor concentración. Utilizando 1 mg proteína/ml de fase acuosa, la emulsión preparada con PSS<sub>ac-4,5</sub> separa una cantidad de aceite significativamente mayor respecto de PSS<sub>am-4,5</sub> (Figura 34).



**Figura 34:** Aceite separado porcentual (AS%) de emulsiones o/w obtenidas con las concentraciones proteína/ml indicadas. Letras o intervalos de letras sobre las barras indican valores medios significativamente diferentes entre muestras ( $p < 0,05$ ).

Este comportamiento no puede explicarse en base al tamaño de las gotas que forman la emulsión, de hecho  $D_{4,3}$  de PSS<sub>am-4,5</sub> es significativamente mayor que el de PSS<sub>ac-4,5</sub> (Tabla 39), indicando que la emulsión que separa menos aceite es la formada por gotas más grandes. Adicionalmente, la fase crema formada con PSS<sub>am-4,5</sub> tampoco es la más hidratada, de hecho es significativamente menos hidratada que la correspondiente a PSS<sub>ac-4,5</sub> (Figura 33).

### 6.2.1 Comparación entre proteínas aisladas y sueros deshidratados

Si bien en las secciones anteriores se dejó evidencia que las emulsiones elaboradas con sueros son menos estables que las correspondientes obtenidas con sus proteínas aisladas,

## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

en esta sección se presentan todos los parámetros que caracterizan a las emulsiones en forma conjunta para analizarlos con más profundidad.

En la Tabla 40 se comparan los principales parámetros obtenidos a partir de emulsiones preparadas con 5 mg de proteína en fase acuosa de SSL, PSS<sub>am-4,5</sub> o PSS<sub>ac-4,5</sub>. Dado que las emulsiones (con sueros o proteínas) fueron preparadas con niveles equivalentes de proteína, las diferencias dan cuenta de los efectos de los componentes no proteicos presentes en los sueros, en sí mismos o por interacción con las proteínas, sobre la formación y estabilidad de las emulsiones obtenidas.

**Tabla 40:** Parámetros de emulsiones o/w obtenidas con 5 mg proteína/ml de las muestras analizadas. Los parámetros de las emulsiones preparadas con SSL provienen de las Tablas 35-38, mientras que los correspondientes a PSS<sub>am-4,5</sub> y PSS<sub>ac-4,5</sub> lo hacen de la Tabla 39 y de las Figuras 31-34.

	SSL	PSS <sub>am-4,5</sub>	PSS <sub>ac-4,5</sub>
<b>BS<sub>0prom</sub> (%)</b>	48,22 ± 0,63 <sub>1</sub>	58,15 ± 0,38 <sub>2</sub>	57,66 ± 0,13 <sub>2</sub>
<b>K (min.<sup>-1</sup>)</b>	12,42 ± 0,99 <sub>1</sub>	4,00 ± 0,18 <sub>2</sub>	0,99 ± 0,05 <sub>3</sub>
<b>FC%</b>	45,68 ± 1,99 <sub>1</sub>	44,87 ± 5,02 <sub>1</sub>	60,73 ± 5,25 <sub>2</sub>
<b>IAE (+ SDS)</b>	20,31 ± 3,25 <sub>1</sub>	23,26 ± 2,55 <sub>1</sub>	32,16 ± 5,17 <sub>2</sub>
<b>IAE (- SDS)</b>	18,36 ± 1,84 <sub>1</sub>	24,3 ± 3,36 <sub>2</sub>	26,57 ± 5,72 <sub>2</sub>
<b>D<sub>4,3</sub> (+ SDS)</b>	45,54 ± 2,10 <sub>1</sub>	46,32 ± 1,26 <sub>1</sub>	39,40 ± 1,18 <sub>2</sub>
<b>D<sub>4,3</sub> (- SDS)</b>	70,58 ± 2,59 <sub>1</sub>	47,05 ± 1,22 <sub>2</sub>	39,64 ± 1,19 <sub>3</sub>
<b>GFi (%)</b>	55,0 ± 2,5 <sub>1</sub>	1,6 ± 0,1 <sub>2</sub>	0,6 ± 0,1 <sub>3</sub>
<b>AS (%)</b>	3,29 ± 0,74 <sub>1</sub>	1,19 ± 0,15 <sub>2</sub>	1,08 ± 0,17 <sub>2</sub>

Números subíndices diferentes en una misma fila indican valores medios significativamente diferentes (p<0,05).

Estos componentes no proteicos son principalmente carbohidratos y sales. En el SSL los componentes mayoritarios son los carbohidratos (68,0%) seguido de las proteínas (16,3%) y las sales (13,8%) (Tabla 7). Analizando la Tabla 40 surge inmediatamente que, la presencia de hidratos de carbono (simples y complejos) y de sales en el suero produce una reducción de la estabilidad frente a la separación gravitacional lo que se condice con la formación de emulsiones más floculadas y por ende con mayor tamaño de partícula. La K y el GFi de la emulsión preparada con SSL son 3 y 34 veces mayor respecto a la emulsión obtenida con PSS<sub>am-4,5</sub>, siendo las diferencias aún mayores respecto a PSS<sub>ac-4,5</sub> (Tabla 40). La presencia de sales y azúcares en el suero deshidratado dificultan la formación de la interfase por lo que se obtiene una emulsión formada por gotas más grandes que da una fase crema levemente menos hidratada y con una separación mayor de aceite.



## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

Para el SSL el  $BS_{0prom}(\%)$  al igual que el IAE en ausencia de SDS resultan significativamente menores respecto a los valores hallados para  $PSS_{am-4,5}$  o  $PSS_{ac-4,5}$ , lo que se corresponde con mayor valor de  $D_{4,3}$  en ausencia de SDS. El valor de FC% para SSL es significativamente menor respecto a  $PSS_{ac-4,5}$  ( $p < 0,05$ ; Tabla 40). La emulsión obtenida con SSL separa una cantidad de aceite significativamente mayor respecto a  $PSS_{am-4,5}$  o  $PSS_{ac-4,5}$  ( $p < 0,05$ ).

De igual modo, en la Tabla 41 se compara el desempeño del STL respecto a  $PST_{ac-5,5}$ . Nuevamente la presencia de sales y oligosacáridos disminuye en forma significativa la estabilidad frente a la separación gravitacional y frente a la separación de aceite, aunque las diferencias suero de tofu-proteína aislada son mucho menores que las que se observaron en la Tabla 40 entre suero de soja y sus proteínas aisladas.

**Tabla 41:** Parámetros de emulsiones o/w obtenidas con 5 mg proteína/ml de las muestras analizadas. Los parámetros de las emulsiones preparadas con SSL provienen de las Tablas 35-38, mientras que los correspondientes a  $PSS_{am-4,5}$  y  $PSS_{ac-4,5}$  lo hacen de la Tabla 39 y de las Figuras 31-34.

	STL	$PST_{ac-5,5}$
$BS_{0prom}(\%)$	$59,51 \pm 0,77$ <sub>1</sub>	$57,92 \pm 0,36$ <sub>2</sub>
$K(\text{min.}^{-1})$	$1,57 \pm 0,13$ <sub>1</sub>	$0,82 \pm 0,04$ <sub>2</sub>
FC%	$55,14 \pm 2,41$ <sub>1</sub>	$54,49 \pm 7,08$ <sub>1</sub>
IAE (+ SDS)	$27,72 \pm 4,16$ <sub>1</sub>	$37,74 \pm 4,26$ <sub>2</sub>
IAE (- SDS)	$19,09 \pm 2,71$ <sub>1</sub>	$31,23 \pm 4,54$ <sub>2</sub>
$D_{4,3}$ (+ SDS)	$31,99 \pm 0,98$ <sub>1</sub>	$33,98 \pm 1,02$ <sub>1</sub>
$D_{4,3}$ (- SDS)	$35,41 \pm 1,12$ <sub>1</sub>	$37,11 \pm 1,11$ <sub>1</sub>
GFi (%)	$10,7 \pm 0,6$ <sub>1</sub>	$9,2 \pm 0,3$ <sub>2</sub>
AS (%)	$1,71 \pm 0,03$ <sub>1</sub>	$0,52 \pm 0,37$ <sub>2</sub>

Números subíndices diferentes en una misma fila indican valores medios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Esta mayor similitud entre el suero y la proteína aislada para el caso del suero de tofu, puede entenderse si se toma en cuenta que estas proteínas tienen un alto grado de desnaturalización y un contenido muy elevado de calcio tanto cuando se encuentran en el suero como cuando están aisladas (Tablas 9 y 21). Estas características son las que predominan en su comportamiento como agente emulsificante y por lo tanto los demás componentes no proteicos del suero de tofu tienen un efecto comparativamente menor.

Sin embargo si se hallaron diferencias entre las emulsiones STL y  $PST_{ac-5,5}$ , por un lado la emulsión obtenida con el STL resulta menos estable frente a la separación gravitacional dando emulsiones más floculadas en donde el área creada es menor. La K y el GFi de la

## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

emulsión preparada con STL resulta 1,9 y 1,2 veces mayor respecto a la emulsión obtenida con  $PST_{ac-5,5}$ , mientras que los valores de IAE (con o sin SDS) son significativamente menores respecto a  $PST_{ac-5,5}$ , separando esta última una cantidad de aceite significativamente menor respecto a STL ( $p < 0,05$ ; Tabla 41).

Adicionalmente se hallaron diferencias al realizar ensayos de estabilidad durante el almacenamiento. Los flóculos presentes en las emulsiones preparadas con  $PST_{ac-5,5}$  resultaron estables después de un almacenamiento estacionario de 8 h, lo cual se interpreta como ausencia de coalescencia. Por el contrario, para STL el GF se redujo desde el valor inicial de 10,7% (Tabla 41) a un valor residual de 0,3%, indicando un avanzado proceso de coalescencia durante un almacenamiento similar.

### **6.3 Emulsiones preparadas con suero de soja deshidratado y calentado**

#### *Desestabilización en condiciones estacionarias e índice de actividad emulsificante:*

Previamente (sección 3.3) mostramos que el tratamiento térmico del SS para obtener el SSST redujo la AAR a menos del 5% (referencia SSL), pero también redujo la capacidad emulsionante, dando el suero deshidratado con las peores propiedades emulsificantes.

En esta sección analizamos la capacidad de formar y estabilizar emulsiones que tiene el SSLC (150). La elección de esta muestra se debe a que el tratamiento térmico en condiciones de baja humedad permite una inactivación de los factores antritripticos superior al 95% sección 3.3.1, similar a la alcanzada en el SSST. Sin embargo, el calentamiento en estas condiciones favorece el proceso de glicosilación de las proteínas lo que según trabajos previos (Matemu y col., 2009) mejoraría sus características emulsionantes.

La Tabla 42 muestra los parámetros obtenidos a partir de ensayos *Quick Scan* de emulsiones preparadas con SSLC (150) a tres niveles de concentración de proteína en la fase acuosa (1, 5 o 10 mg proteína/ml). Se incluye, con fines comparativos, los datos correspondientes a las emulsiones preparadas con SSL. En todo el rango de concentración el  $BS_{0prom}(\%)$  de las emulsiones preparadas con SSLC (150) es significativamente mayor que el correspondiente a emulsiones formadas con igual cantidad de SSL. Esta mayor creación de área interfacial fue confirmada con el IAE. Para la emulsión SSLC (150) preparada con 5 mg proteína/ml, los valores de IAE con y sin SDS son  $33,46 \pm 4,54$  y

## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

26,94 ± 2,26 m<sup>2</sup>/g. Estos valores son significativamente mayores a los hallados con SSL los cuales se ubican en el rango 18-20 m<sup>2</sup>/g (p<0,05; Tabla 36). Adicionalmente, en todo el rango de concentraciones, las emulsiones preparadas con SSLC (150) presentan valores de K significativamente menores (referencia SSL), indicando que el tratamiento térmico del SSL no solo aumenta el área interfacial formada sino que mejora la estabilidad frente el cremado (p<0,05; Tabla 42).

**Tabla 42:** Parámetros obtenidos a partir de perfiles de Quick Scan en la zona baja de emulsiones o/w obtenidas con 1, 5 o 10 mg proteína/ml de las muestras analizadas. Las abreviaturas de los parámetros son los de la Tabla 35.

Muestra	Proteína (mg/ml)	BS <sub>0prom</sub> (%)	K	FC%
SSL	1	37,69 ± 1,70 <sup>a</sup>	13,29 ± 0,69 <sup>a</sup>	29,62 ± 3,35 <sup>a</sup>
	5	48,22 ± 0,63 <sup>b</sup>	12,42 ± 0,99 <sup>a</sup>	45,68 ± 1,99 <sup>b</sup>
	10	52,96 ± 0,63 <sup>c</sup>	1,57 ± 0,33 <sup>b</sup>	45,98 ± 0,42 <sup>b</sup>
SSLC (150)	1	50,55 ± 2,28 <sup>b,c</sup>	6,45 ± 1,33 <sup>c</sup>	53,38 ± 0,49 <sup>c</sup>
	5	56,83 ± 0,73 <sup>d</sup>	4,37 ± 0,34 <sup>d</sup>	54,58 ± 6,18 <sup>c</sup>
	10	56,33 ± 0,68 <sup>d</sup>	3,12 ± 0,22 <sup>e</sup>	56,26 ± 2,46 <sup>c</sup>

Letras superíndice diferentes indican valores medios significativamente diferentes en una misma columna (p<0,05).

Luego de 24 h de almacenamiento las emulsiones preparadas con SSLC (150) formaron en todo el rango de concentraciones ensayado, fases crema con un grado de hidratación comparables entre sí y significativamente mayor al de las cremas de las emulsiones preparadas con SSL (p<0,05; Tabla 42).

Cabe mencionar que la mejora en el desempeño como agente emulsificante en el SSLC (150) es de tal magnitud que se requiere de 10 veces la cantidad de SSL para equipararla, o sea que una emulsión preparada con 1 mg proteína/ml de fase acuosa empleando SSLC (150) presenta un valor de BS<sub>0prom</sub>(%) comparable al obtenido con 10 mg proteína/ml de SSL.

**Distribución de tamaño de partícula:** Las emulsiones preparadas con SSLC (150) a un nivel de 5 mg/ml, registran valores de D<sub>4,3</sub> de 34,54 ± 1,22 y 40,03 ± 1,48 μm con y sin SDS respectivamente, resultando un GFi de 12,6%. Los D<sub>4,3</sub> son significativamente menores que los hallados para las emulsiones preparadas con cantidades equivalentes de SSL que se ubican en el rango 45-71 μm (p<0,05; Tabla 37). Estos valores de D<sub>4,3</sub>

## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

confirman los hallazgos realizados a partir de las determinaciones de  $BS_{0prom}(\%)$  e IAE que muestran que las emulsiones preparadas con SSLC (150) están formadas por gotas más chicas.

El GFi de las emulsiones preparadas con SSLC (150) es 4,4 veces menor que el correspondiente a emulsiones formuladas con SSL mostrando que las emulsiones preparadas con SSLC (150) no solo tienen gotas más chicas sino que además son menos floculadas. Esta baja tendencia a la floculación puede tener una relación directa con la presencia de proteínas glicosiladas, las cuales ejercen un efecto de repulsión estérica y de hidratación muy importante por la presencia de polisacáridos en la interfase. Ya fue mencionado que, las proteínas glicosiladas tienen una mayor capacidad de estabilizar emulsiones respecto a las mismas proteínas no glicosiladas, sin embargo se observa una mejora significativa cuando en la glicosilación de las proteínas se reemplazan azúcares simples con oligo o polisacáridos debido a que se produce una combinación ideal entre las buenas propiedades emulsificantes de las proteínas y la capacidad de estabilización de los polisacáridos (Einhorn-Stoll col., 2005 y Zhu y col., 2010). Recientemente (Zhuo y col., 2013) analizaron la estabilidad de emulsiones preparadas con proteínas glicosiladas que ellos mismos obtuvieron mediante reacción entre una proteína y un polisacárido en condiciones controladas similares a las nuestras (60°C, pH = 6,5 durante 30 h) hallando cambios significativos en la estructura secundaria y terciaria de las proteínas glicosiladas y un aumento en la flexibilidad estructural. Con estas proteínas glicosiladas prepararon emulsiones o/w las cuales resultaron más estables frente a la floculación (referencia proteínas no glicosiladas). Estos autores atribuyeron esta mayor estabilidad tanto a los cambios estructurales de la proteína debido a la glicosilación como a la presencia de carbohidratos unidos y no unidos presentes en la interfase.

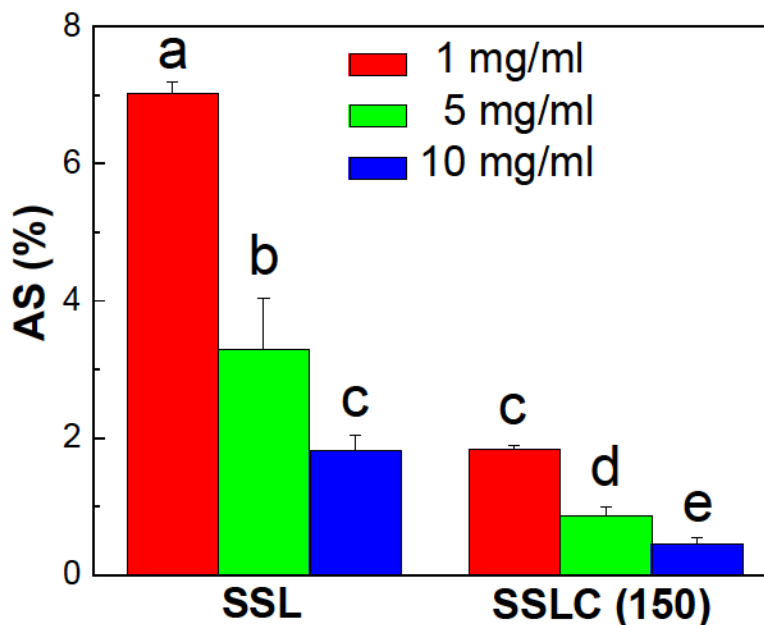
En nuestros ensayos, tras un almacenamiento de 8 h en condiciones estacionarias a temperatura ambiente se determinó nuevamente la DTP, el GF% y GC%. El GF disminuyó hasta 6,6% registrándose un GC de 150,3%. Estos resultados indican que, aunque las emulsiones preparadas con SSLC (150) tienen un GFi mucho menor que el correspondiente a emulsiones formuladas con SSL se desestabiliza por coalescencia. Tras el almacenamiento el  $D_{4,3}$  con y sin SDS se ubica en el rango 89-95  $\mu\text{m}$ .

***Aceite separado:*** En la Figura 35 puede verse para ambos sueros una reducción en la cantidad de AS% a medida que se aumenta la cantidad de proteína utilizada para preparar la emulsión. En todos los casos el AS% es significativamente menor para SSLC (150)



## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

respecto a cantidades equivalentes de SSL. El valor de AS% de las emulsiones preparadas con 1 mg proteína/ml de fase acuosa de SSLC (150) resulta equivalente al de las emulsiones preparadas con 10 mg proteína/ml de SSL.



**Figura 35:** Aceite separado porcentual (AS%) de emulsiones o/w obtenidas con las cantidades de proteína/ml indicadas. Letras diferentes sobre las barras indican valores medios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Previamente, cuando analizamos la composición de estos sueros, observamos que SSL y SSLC (150) poseen una gran cantidad de carbohidratos alcanzando una alta relación carbohidratos: proteína (4,2: 1; Tabla 7). Pese a que la presencia de carbohidratos puede aumentar el grado de floculación y mejorar algunos aspectos de la emulsión como la estabilidad frente al cremado, la capacidad emulsificante de una proteína mejora si se la glicosila por reacciones del tipo Maillard (Kato y col., 1988; Kato y col., 1990; Handa y Kuroda, 1999 y Nakamura y col., 1991). La glicosilación se ve favorecida realizando el tratamiento térmico en condiciones de baja humedad, como en el caso del SSLC (150). Por lo dicho el mejor desempeño del SSLC (150) respecto del SSL podría atribuirse al mayor grado de glicosilación de las proteínas en el SSLC (150).

Las proteínas en el SSLC (150) tienen una relación HC-P 3,1 veces mayor respecto a SSL (Tabla 11) y debido a las condiciones del calentamiento se puede asegurar que hay una glicosilación efectiva. Está bien documentado que las proteínas glicosiladas presentan una notable mejora en varias de las propiedades funcionales especialmente en la capacidad de

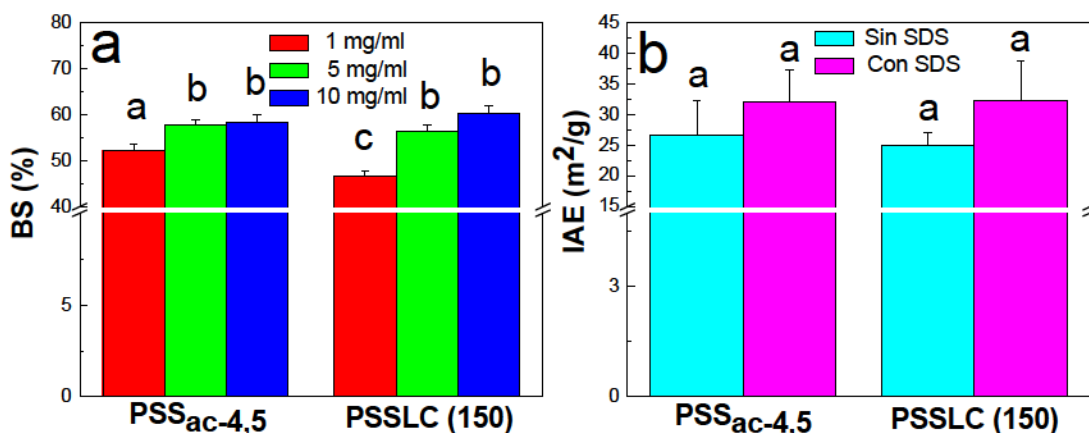
formar y estabilizar emulsiones (Fujiwara y col., 1998; Song y col., 2002; Laura y col., 2005 y Akhtar y Dickinson, 2007), lo cual está en concordancia con nuestros resultados.

### 6.4 Emulsiones preparadas con proteínas aisladas de suero de soja deshidratado y calentado

#### *Desestabilización en condiciones estacionarias e índice de actividad emulsificante:*

Analizaremos la desestabilización en condiciones estacionarias de emulsiones preparadas con proteínas de SSLC (150) precipitadas con acetona de forma comparativa con PSS<sub>ac-4,5</sub> debido a que comparten la misma metodología de obtención. En la Figura 36a se muestran los valores de BS<sub>0prom</sub>(%) a las tres concentraciones analizadas mientras que en la Figura 36b se presentan los valores de IAE correspondiente a emulsiones o/w preparadas con 5 mg proteína/ml de PSSLC (150) o PSS<sub>ac-4,5</sub> en la fase acuosa.

Los valores de BS<sub>0prom</sub>(%) e IAE de las emulsiones preparadas con cantidades medias o altas de PSSLC (150) resultan comparables a los hallados para PSS<sub>ac-4,5</sub> (Figura 36). Esto indica que el área creada, así como la cantidad y tamaño de gota en las emulsiones preparadas con ambos tipos de proteína son equivalentes.



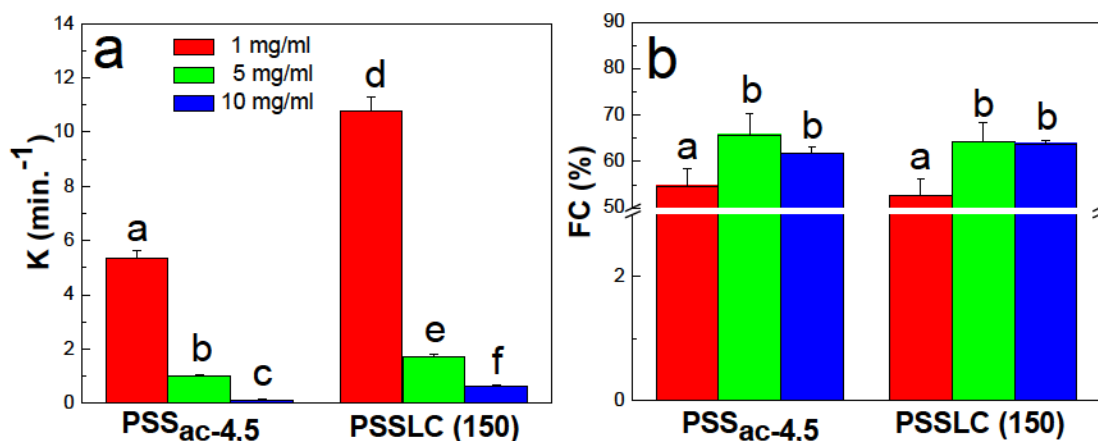
**Figura 36:** a) BS (%): Backscattering inicial porcentual de emulsiones o/w obtenidas con las cantidades de proteína/ml indicadas. b) IAE: Índice de actividad emulsificante con y sin SDS de emulsiones con 5 mg proteína/ml. Letras diferentes entre barras indican valores medios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

En la Figura 37 se analiza la desestabilización en dos momentos y zonas diferentes de la emulsión para poner en evidencia posibles diferencias. Por un lado en la Figura 37a se analiza la velocidad de cremado mediante la constante K en la zona baja de la emulsión al

## Emulsiones con sueros y proteínas aisladas

comienzo de la desestabilización, mientras que en la Figura 37b se analiza el grado de hidratación de la crema formada en la parte superior de la emulsión luego de 24 h de almacenamiento estacionario.

En todo el rango de concentraciones se encontraron valores más altos de K para PSSLC (150) respecto a los valores correspondientes a las emulsiones preparadas con concentraciones equivalentes de PSS<sub>ac-4,5</sub> (Figura 37a) lo que indica una mayor desestabilización por cremado empleando PSSLC (150).



**Figura 37:** a) K: Constante cinética de separación gravitacional. b) FC%: Fase crema porcentual de emulsiones o/w obtenidas con las cantidades de proteína/ml indicadas. Letras diferentes entre barras indican valores medios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Sin embargo el grado de hidratación de las cremas a concentraciones iguales resulta equivalente (Figura 37b), lo que indica que aunque las gotas de la emulsión preparada con PSSLC (150) se separan más rápido que las emulsiones formuladas con PSS<sub>ac-4,5</sub> terminan formando cremas con un grado de hidratación comparable.

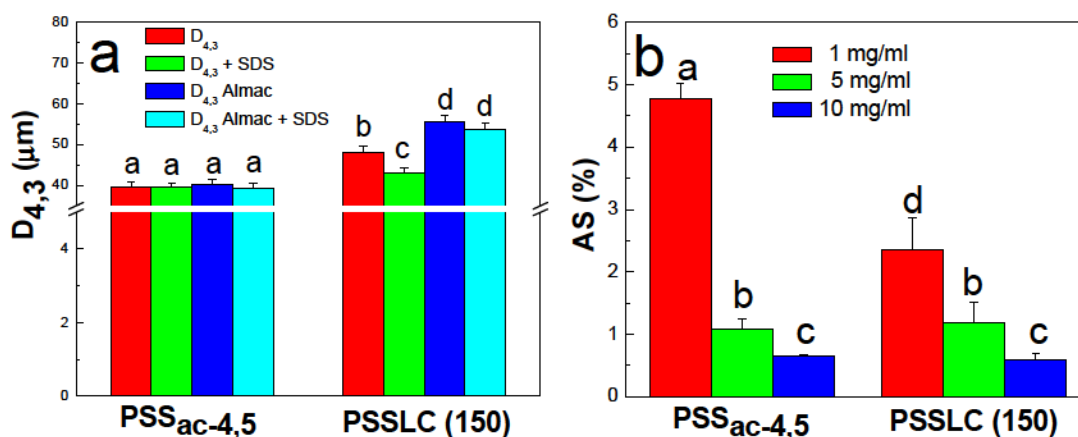
**Distribución de tamaño de partícula y aceite separado:** Los  $D_{4,3}$  (con o sin SDS) de las emulsiones preparadas con PSSLC (150) son significativamente mayores que los hallados para PSS<sub>ac-4,5</sub> ( $p < 0,05$ ; Figura 38a). Previamente habíamos obtenido una tendencia similar a la menor concentración a partir de las medidas de  $BS_{0prom}(\%)$ .

Los GF<sub>i</sub> de las emulsiones preparadas con PSS<sub>ac-4,5</sub> y PSSLC (150) son 0,6 y 12,0% respectivamente. Este resultado resulta llamativo dado que PSSLC (150) es una proteína que alcanza un avanzado grado de glicosilación y es sabido que las proteínas glicosiladas son mejores agentes emulsificantes y estabilizantes que las proteínas no glicosiladas. Sin

## Emulsiones con sueros y proteínas aisladas

embargo, la validez de esta afirmación depende de tener en la interfase cantidades de proteínas iguales o al menos comparables, cosa que no sucede entre estas proteínas debido a la menor solubilidad de PSSLC (150) (sección 5.3).

Bajo las mismas condiciones la solubilidad de PSS<sub>ac-4,5</sub> es 1,9 veces mayor que la correspondiente a PSSLC (150) (Tablas 26 y 28). Una menor cantidad de proteína en la interfase, si no es suficiente para cubrir el área creada durante la homogeneización, determina la formación de flóculos mediados por interacciones proteína-proteína según el mecanismo de puenteo (Thanasukarn y col, 2004a).



**Figura 38:** a)  $D_{4,3}$ : Diámetro promedio De Brouker sin y con SDS (+ SDS) de emulsiones o/w obtenidas con 5 mg de proteína/ml de las proteínas indicadas. Almac: Indica un almacenamiento estacionario de la emulsión (8 h) b) AS%: Aceite separado porcentual de emulsiones o/w obtenidas con 1, 5 o 10 mg de proteína/ml ( $p < 0,05$ ).

El almacenamiento estacionario casi no aumentó el  $D_{4,3}$  ( $\Delta D_{4,3} < 0,6 \mu\text{m}$ , con o sin SDS) en las emulsiones preparadas con PSS<sub>ac-4,5</sub>, pero por el contrario sí produjo un aumento para las emulsiones preparadas con PSSLC (150). Tras el almacenamiento el GF de las emulsiones preparadas con PSSLC (150) se redujo a 3,5% mientras que su GC fue superior al 25%, indicando que la emulsión floculada preparada con PSSLC (150) se desestabilizó por coalescencia.

Los valores de AS% indican que PSSLC (150) da emulsiones más estables en todo el rango de concentraciones ensayadas y que libera una cantidad de aceite significativamente menor respecto a PSS<sub>ac-4,5</sub> ( $p < 0,05$ ; Figura 38b). Aunque ambas proteínas forman cremas con un grado de hidratación comparable PSSLC (150) se destacó como un mejor agente estabilizante dando emulsiones más estables que liberan una menor cantidad de aceite. El hecho que una menor cantidad PSSLC (150) en la interfase tenga una capacidad similar de



## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

ligar agua que una cantidad mayor de  $PSS_{ac-4,5}$  se podría explicar por la presencia de proteínas desnaturalizadas (sección 4.2.2) y glicosiladas en PSSLC (150). El parámetro HC-P para PSSLC (150) es significativamente mayor respecto a  $PSS_{ac-4,5}$  (Tablas 10 y 11). Los resultados sugieren entonces que el mayor grado de glicosilación de PSSLC (150) y la total desnaturalización compensan la pérdida de solubilidad y por ende la menor cantidad de esta proteína que puede ser adsorbida en la interfase.

### **6.5 Emulsiones preparadas con proteínas aisladas y luego desnaturalizadas en dispersión acuosa**

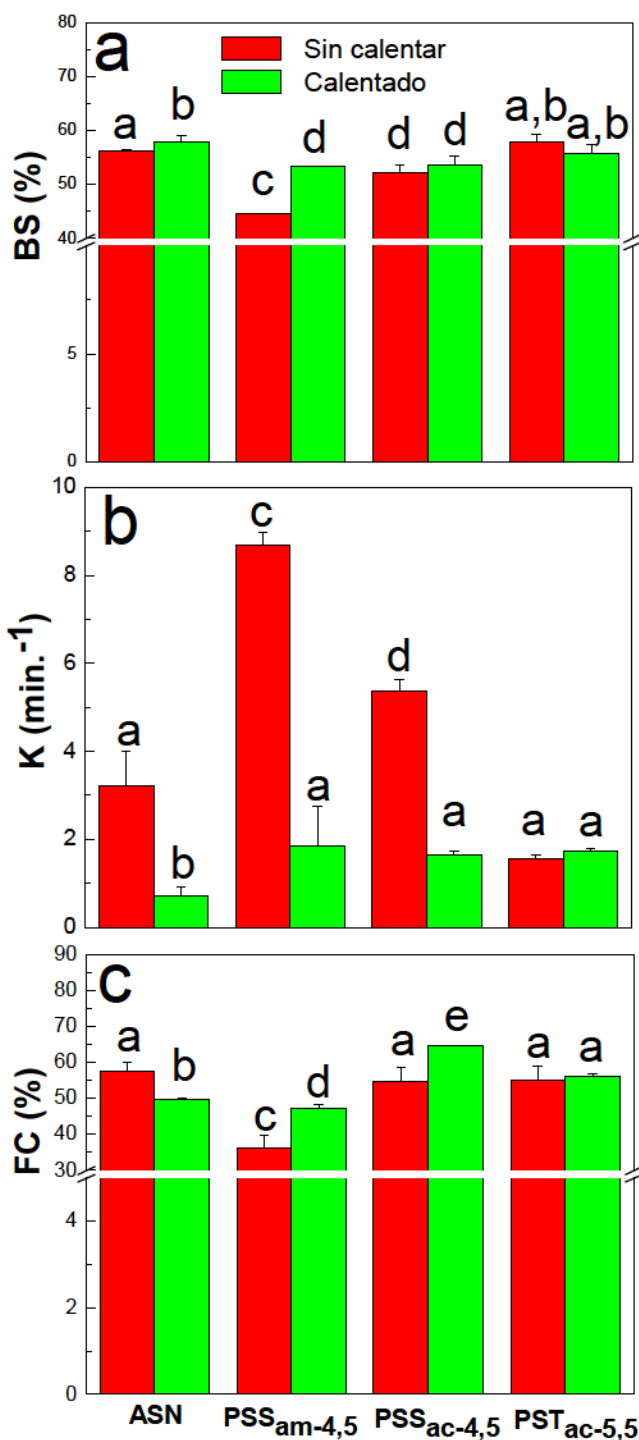
A continuación analizaremos emulsiones equivalentes a las analizadas en 6.2 preparadas con ASN,  $PSS_{am-4,5}$ ,  $PSS_{ac-4,5}$  o  $PST_{ac-5,5}$  a un nivel de 1,0 mg proteína/ml en la fase acuosa. Esta condición fue elegida en base a los resultados previos en donde las diferencias se acentúan con la disminución en la concentración. Adicionalmente, otras determinaciones ya analizadas tales como solubilidad, fluorescencia intrínseca, hidrofobicidad superficial y tensión superficial en condiciones nativas o desnaturalizadas fueron medidas en esta concentración empleando el mismo buffer lo que facilita la discusión de los resultados. Las dispersiones proteicas fueron tratadas térmicamente a 100°C durante 5 min., condición suficiente para alcanzar la desnaturalización total (Mitidieri y Wagner, 2002).

**Desestabilización en condiciones estacionarias:** En la Figura 39a se observa que para ASN y  $PSS_{am-4,5}$  el tratamiento térmico de las dispersiones previo a la preparación de la emulsión produce un aumento significativo en el  $BS_{0prom}(\%)$  indicando una mayor creación de área interfacial. Mitidieri y Wagner (2002) hallaron que el IAE de ASN y  $PSS_{am}$  desnaturalizadas fue mayor que el de emulsiones equivalentes preparadas con proteínas no calentadas. Además, el  $BS_{0prom}(\%)$  de las emulsiones preparadas con ASN con o sin tratamiento térmico resulta significativamente mayor respecto a  $PSS_{am-4,5}$  y  $PSS_{ac-4,5}$  y comparable a  $PST_{ac-5,5}$  ( $p < 0,05$ ; Figura 39a).

El aumento en la actividad emulsionante de las dispersiones ASN y  $PSS_{am-4,5}$  puede ser atribuido al alto grado de desnaturalización y bajo grado de agregación de sus proteínas lo cual mejora sus propiedades interfaciales. Según Sorgentini y col. (1995) a una baja concentración proteica como es 1,0 mg/ml se reduce la formación de agregados durante el

## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

calentamiento favoreciéndose el desplegamiento de las proteínas, las que tiene mayores posibilidades de incorporarse a una interfase en formación.



**Figura 39:** a) BS (%): Backscattering inicial porcentual. b) K: Constante cinética de separación gravitacional. c) FC (%): Fase crema de emulsiones o/w obtenidas con 1,0 mg de proteína/ml de las proteínas aisladas. Sin calentar y Calentado: Indica que las emulsiones fueron preparadas con las dispersiones proteicas en forma directa o luego de haber sido tratadas térmicamente a 100°C durante 5 min.

## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

Este aumento del  $BS_{0prom}(\%)$  de las proteínas calentadas respecto de las no calentadas para ASN y  $PSS_{am}$  ya fue informado por Palazolo y col. (2004). Los valores de  $BS_{0prom}(\%)$  informados fueron 48 y 52% para ASN y ASN calentado respectivamente y de 49 y 53% para  $PSS_{am}$  y  $PSS_{am}$  calentado respectivamente. Los valores comparables del  $BS_{0prom}(\%)$  entre  $PST_{ac-5,5}$  sin o con tratamiento térmico se atribuye al grado de desnaturalización total de esta proteína, razón por la cual resulta poco afectada por un tratamiento térmico adicional.

La estabilidad frente al cremado de estas emulsiones, evaluada mediante la constante K indica aumentos significativos con el calentamiento para todas las proteínas analizadas excepto  $PST_{ac-5,5}$  ( $p < 0,05$ ; Figura 39b). Se debe notar que, para las emulsiones preparadas con proteína no calentada, la estabilidad frente al cremado disminuía siguiendo el orden:  $PST_{ac-5,5} > PSS_{ac-4,5} > PSS_{am-4,5}$  mientras que luego del tratamiento térmico las estabilidad frente el cremado resulta comparable para las tres proteínas, indicando que la desnaturalización es capaz de equiparar la estabilidad frente al cremado.

En la Figura 39c se observan aumentos significativos en el grado de hidratación de la fase crema para  $PSS_{am-4,5}$  y  $PSS_{ac-4,5}$  no observándose cambios apreciables para  $PST_{ac-5,5}$ . Este aumento en el grado de hidratación hallado con  $PSS_{am}$  coincide con lo informado por Palazolo y col. (2004). Estos autores explicaron este resultado en base a la microestructura de las emulsiones; en las emulsiones preparadas con  $PSS_{am}$  no calentada los flóculos forman una red más cerrada con una menor capacidad de retener agua, mientras que con la proteína tratada térmicamente se forma una red más abierta que retiene una mayor cantidad de agua. Adicionalmente estos autores postularon que, debido al aumento en la hidrofobicidad causado por la exposición de grupos no polares, inicialmente ocultos en la interior de la proteína, es posible la formación de interacciones coloidales entre las gotas que permite la formación de cremas más hidratadas. Para el caso de la crema obtenida con  $PSS_{am}$  calentada estos autores hallaron que la misma ocupaba el 50% del volumen total de la emulsión, tal como se observa en la Figura 39c.

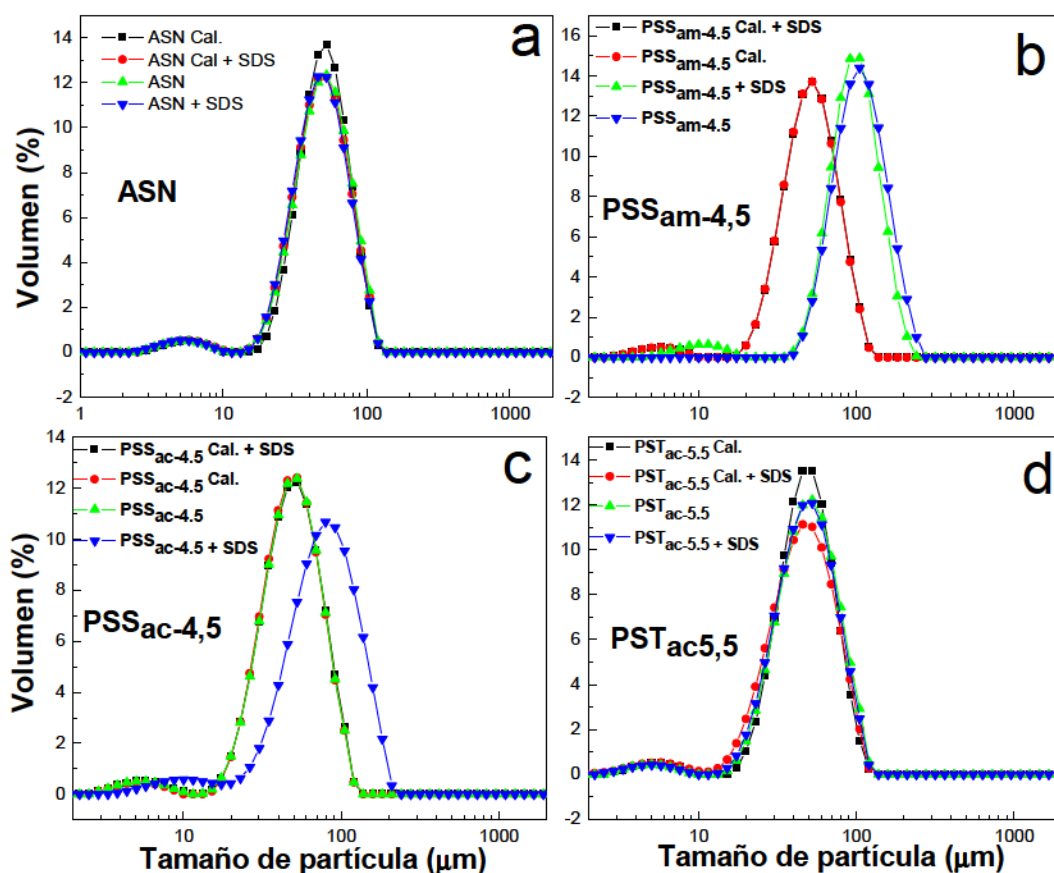
En nuestros ensayos, las proteínas desnaturalizadas forman fases crema que ocupan porcentajes en el rango 47-65%, siendo lo más notable el aumento de la estabilidad al cremado hallado para  $PSS_{am-4,5}$  y  $PSS_{ac-4,5}$  (Figura 39b,c). Este resultado se correlaciona perfectamente con los aumentos de la hidrofobicidad y la mayor exposición de grupos hidrofóbicos ocultos en las proteínas no calentadas. La hidrofobicidad superficial de  $PSS_{am-4,5}$  o  $PSS_{ac-4,5}$  medida en dispersiones acuosas calentadas conteniendo 1,0 mg

## Emulsiones con sueros y proteínas aisladas

proteína/ml registró un aumento entre 3,8 y 5,7 veces respecto a las mismas dispersiones no calentadas (Tabla 34).

Los resultados en conjunto nos permiten decir que las emulsiones preparadas con dispersiones acuosas de proteínas de suero tratadas térmicamente resultan más estables frente al cremado y forman cremas con grados de hidratación mayores a los hallados en las emulsiones formadas con proteínas no calentadas.

**Distribución de tamaño de partícula:** Las DTP de emulsiones preparadas con dispersiones acuosas de ASN, PSS<sub>am-4,5</sub>, PSS<sub>ac-4,5</sub> o PST<sub>ac-5,5</sub> conteniendo 1,0 mg de proteína/ml, en forma directa o luego de realizar un tratamiento térmico (100°C, 5 min.) se muestran en la Figura 40.



**Figura 40:** Distribución de tamaño de partícula de emulsiones o/w preparadas con 1,0 mg de proteína/ml de las proteínas indicadas. Cal: Indica el tratamiento térmico de las dispersiones proteicas (100°C, 5 min.) previo a la preparación de la emulsión. + SDS: Indica el empleo del agente defloculante durante la medida.



## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

Puede verse que todas las emulsiones preparadas son multimodales, comportamiento que ya fue informado y atribuido fundamentalmente al tipo de homogenizador y rotor utilizado (Mitidieri y Wagner, 2002; Palazolo y col., 2004).

Para el caso de ASN (Figura 40a) se registran pocos cambios en la DTP con el tratamiento térmico o el empleo de SDS durante la medida. Los valores de  $D_{4,3}$  (con o sin SDS) de las emulsiones preparadas con dispersiones de ASN sin calentar o calentadas estuvieron comprendidos entre 46,6-48,6  $\mu\text{m}$ . El GF para las emulsiones preparadas con ASN sin calentar fue 0,2%, mientras que con las dispersiones calentadas subió al 3,5%.

Palazolo y col. (2003) trabajando con emulsiones equivalentes hallaron también invariabilidad en el IAE y en el tamaño de las gotas entre emulsiones preparadas con ASN con y sin calentamiento. Estos autores atribuyeron este comportamiento a la escasa creación de área y al dispositivo de baja energía empleado en la preparación de las emulsiones de modo que el área creada no logra estabilizarse dando gotas de mayor tamaño.

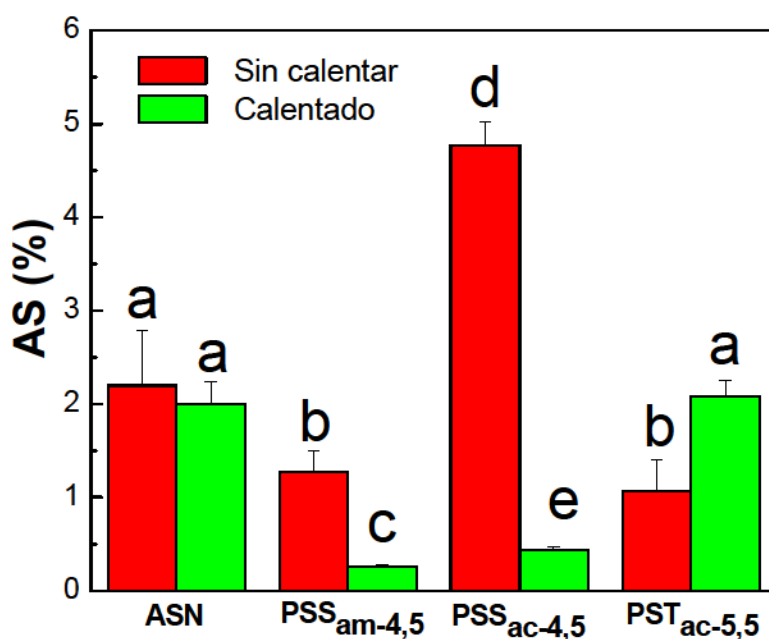
Las DTP de las emulsiones  $\text{PST}_{\text{ac-5,5}}$  también están prácticamente superpuestas cuando son preparadas con dispersiones sin calentar o calentadas, y en presencia o no de SDS, dando valores de  $D_{4,3}$  entre 45,6-48,0  $\mu\text{m}$  con un GF de 5,3%.

Por el contrario para  $\text{PSS}_{\text{am-4,5}}$  y  $\text{PSS}_{\text{ac-4,5}}$  se observa un notable corrimiento de la población mayoritaria de la DTP hacia menores valores de tamaño de partícula luego del tratamiento térmico. La reducción en el tamaño ya había sido anticipada a partir de los aumentos en los valores de  $\text{BS}_{0\text{prom}}(\%)$  que fueron significativos para  $\text{PSS}_{\text{am-4,5}}$  (Figura 39a). Para esta última los  $D_{4,3}$  (con o sin SDS) se ubicaron entre 81,6-82,1  $\mu\text{m}$  para las emulsiones preparadas con dispersiones de  $\text{PSS}_{\text{am-4,5}}$  sin calentar, reduciéndose hasta 48,7-50,5  $\mu\text{m}$  luego del tratamiento térmico.

***Aceite separado:*** Tomando como referencia las emulsiones preparadas con las respectivas proteínas no calentadas, el tratamiento térmico tuvo un efecto diferencial respecto a la cantidad de aceite separado dependiendo de la proteína utilizada en preparar la emulsión. Los resultados se muestran en la Figura 41, en ella puede verse que, con la dispersión calentada de ASN se obtienen emulsiones que liberan una cantidad de AS% comparable a la obtenida con el ASN no calentado. Esto está de acuerdo con la invariabilidad en el tamaño de las gotas con el tratamiento térmico.

## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

Por el contrario, empleando dispersiones calentadas de PSS<sub>am-4,5</sub> y PSS<sub>ac-4,5</sub> se obtienen emulsiones que separan cantidades de aceite significativamente menores, lo que está de acuerdo con el aumento de la estabilidad frente al cremado (disminución significativa en los valores de K, Figura 39b), reducción en el tamaño de gota y el aumento en grado de hidratación. También puede deberse a la naturaleza del film interfacial y la existencia de flóculos más estables. Finalmente la emulsión preparada con PST<sub>ac-5,5</sub> calentado libera una cantidad de aceite significativamente mayor lo que se explica por la formación de agregados proteicos mediados por calcio que forman un film más débil que retiene una menor cantidad de aceite.



**Figura 41:** Aceite separado (AS%) de emulsiones o/w preparadas con 1,0 mg de proteína/ml. Sin calentar y Calentado: Indica que las emulsiones fueron preparadas con las dispersiones proteicas en forma directa o luego de haber sido tratadas térmicamente a 100°C durante 5 min.

### **6.6 Conclusiones parciales**

Las emulsiones preparadas con los sueros deshidratados tienen menor estabilidad que las preparadas con proteínas aisladas. Entre los sueros deshidratados el suero de tofu liofilizado o secado térmicamente permite una mayor formación de área interfacial dando emulsiones con gotas más pequeñas y menos floculadas, que forman una fase crema más hidratada y son más estables frente al almacenamiento dando una menor coalescencia y liberando una menor cantidad de aceite. La mayor estabilidad lograda con el suero

## *Emulsiones con sueros y proteínas aisladas*

industrial puede atribuirse al estado de desnaturalización de las proteínas y al mayor contenido de carbohidratos unidos a ellas con respecto a las presentes en el suero de laboratorio. Además en el suero industrial el mayor contenido de calcio pueden contribuir a la formación de un film interfacial más fuerte dando emulsiones más estables.

El secado térmico a baja temperatura de ambos sueros reduce su capacidad de formar y estabilizar emulsiones, de forma más notable en el suero de soja secado térmicamente debido a la mayor reducción en la solubilidad de sus proteínas respecto del suero de soja liofilizado. Por el contrario el tratamiento térmico del suero de soja liofilizado en condiciones anhidras mejora notablemente su capacidad emulsionante. Las proteínas aisladas con acetona a partir de esta último resultan menos solubles que las proteínas aisladas de forma equivalente (con acetona) desde suero de soja. Pese a esta menor solubilidad dan emulsiones más estables ligando una mayor cantidad de agua en la interfase debido a su mayor grado de glicosilación.

Cuando se analiza el efecto del tratamiento térmico de las proteínas en dispersiones diluidas sobre la formación de emulsiones se encuentra que la estabilidad se reduce cuando se utiliza proteínas de suero de tofu aisladas ya que la aplicación de un tratamiento térmico en presencia de calcio induce la formación de agregados que forman películas menos resistentes a la coalescencia y a liberación de aceite. Por el contrario, la estabilidad aumenta para las proteínas aisladas por precipitación con acetona o con sulfato de amonio a partir de suero de soja a pH 4,5, siendo esta última la que, luego del tratamiento térmico, exhibe las mayores mejoras en la estabilidad global y libera la menor cantidad de aceite.

# **7. Efecto crioprotector de sueros de soja y tofu sobre emulsiones congeladas**



## *Efecto crioprotector de sueros*

Como se detalló en 2.15.1 se realizaron estudios a corto tiempo de almacenamiento congelado a fin de evaluar la actividad crioprotectora de los sueros de soja y de tofu sobre emulsiones o/w preparadas con otras proteínas diferentes a las de suero como emulsificantes. Se eligieron dos proteínas modelo las cuales exhiben diferentes grados de desestabilización al ser sometidas a un proceso de congelación-descongelación. Comenzaremos analizando las posibles combinaciones entre los agentes emulsionantes ASN o caseinato de sodio (CS) y los crioprotectores (STST o SSL) para establecer cual crioprotector funciona mejor para un dado agente emulsificante.

Para ello se prepararon emulsiones con CS a las que se les agregó SSL o STST como agente crioprotector y emulsiones equivalentes empleando ASN sobre las que se ensayó SSL o STST como agente crioprotector. Sobre estas últimas emulsiones se estudiaron las cinéticas de congelamiento. Se utilizó como control a sacarosa en cantidades equivalentes a los crioprotectores ensayados por ser este azúcar el más abundante en los sueros.

### **7.1 Cinética de congelamiento**

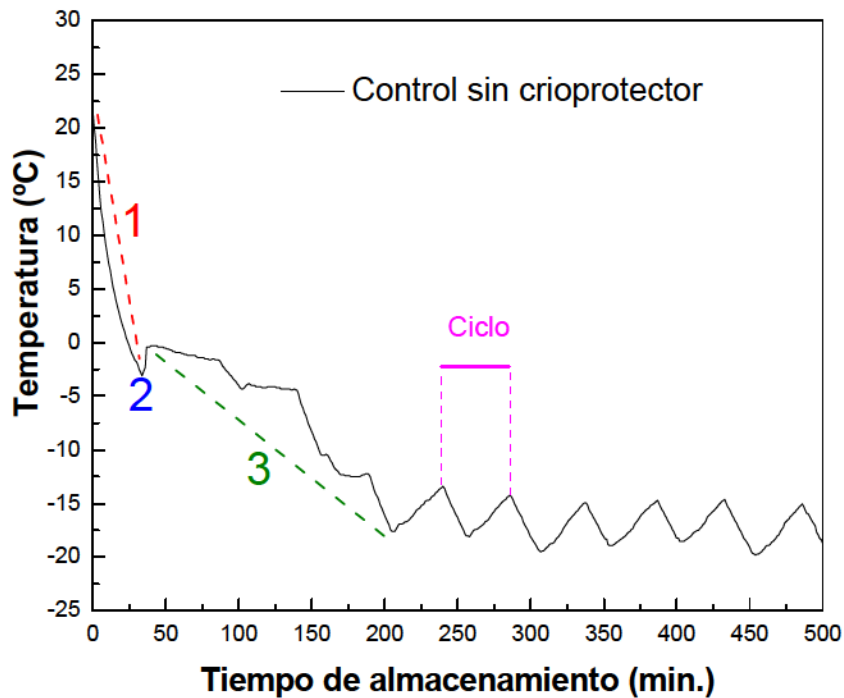
Como se detalló en 2.15.2 se determinó la cinética de congelamiento de las emulsiones de estudio empleando termocuplas ubicadas en el centro y en la periferia de los frascos contenedores a fin de registrar los cambios térmicos en estas dos posiciones. Respecto a la periferia se halló que el enfriamiento fue más lento en el centro de los frascos aunque las diferencias halladas entre ambos puntos rondaron los 0,2°C.

En la Figura 42 se muestra la historia térmica de la emulsión control sin el agregado de crioprotector en la que las principales etapas y puntos de interés se indican con líneas de tendencia y números. Lo primero que se observa es el enfriamiento de la emulsión (indicada con una línea de tendencia roja y con el número 1). Este enfriamiento sucede con una velocidad de  $0,74 \pm 0,1$  °C/min. alcanzando en el punto de subenfriamiento una temperatura de  $-3,1 \pm 0,2$ °C luego de  $34 \pm 1$  min. Tres minutos después, se registra un aumento próximo a 3°C debido al proceso de nucleación (número 2) en donde el agua en estado líquido meta estable por debajo de su punto de congelación se convierte en hielo liberando calor.

A partir de este punto comienza el congelamiento de la emulsión (línea de tendencia verde, número 3). Durante esta etapa se observan en el gráfico varios cambios en la pendiente en la

## *Efecto crioprotector de sueros*

medida que la cantidad de agua no congelada se reduce formándose diferentes sistemas eutécticos. Una comparación entre la etapa de enfriamiento y de congelamiento, líneas de tendencia roja y verde respectivamente, muestra que durante el congelamiento la temperatura se reduce a menor velocidad. Durante el congelamiento la velocidad de enfriamiento se reduce a  $0,10 \pm 0,02$  °C/min. alcanzando  $-18,7 \pm 0,7$ °C luego de  $169 \pm 1$  min. Esta velocidad de congelamiento  $\leq 2$ °C/min. es considerada lenta y se ajusta a la velocidad esperada para un congelador doméstico con aire inmóvil a  $-18$ °C (Cheftel, 1989).



**Figura 42:** Cinética de enfriamiento y congelación de la emulsión ASN sin el agregado de crioprotectores. Se agregan líneas de tendencia y números para explicar las diferentes etapas (ver texto).

Una vez alcanzada la temperatura más baja del congelador comienzan las típicas oscilaciones térmicas de todo equipo de refrigeración, en donde se observa un incremento de la temperatura debido al ingreso de calor a través del aislamiento, seguido de un descenso de la temperatura cuando el equipo reestablece la temperatura seleccionada. Dichas oscilaciones se ubican entre  $-18,7 \pm 0,7$ °C y  $-14,5 \pm 0,5$ °C repitiéndose cada  $49,7 \pm 3,0$  minutos, y se indican en la Figura 42 como “ciclo”. Estas oscilaciones o ciclos térmicos superiores a 4°C cada 50 min. promueven el fenómeno de recristalización en donde los cristales más grandes y estables crecen a expensas de los más pequeños (Cheftel, 1989).

## *Efecto crioprotector de sueros*

En las emulsiones, el agregado de crioprotector reduce el subenfriamiento a  $-3,3 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  siendo este un valor comparable respecto a la emulsión control, y se atribuye a las bajas cantidades de crioprotector utilizadas ( $\leq 5,0\%$  en la emulsión final). Las cinéticas de congelamiento con agregado de diferentes crioprotectores fueron similares, lo cual es esperable debido a que la velocidad de enfriamiento depende de las características del equipo congelador. Se hallaron pequeñas variaciones entre las historias térmicas de algunas muestras las cuales pueden atribuirse a la ubicación relativa de los diferentes frascos dentro del congelador.

Experimentos de congelamiento en DSC realizados con emulsiones con agregado de sacarosa (datos no mostrados) mostraron que, en la medida que se aumenta la cantidad de sacarosa agregada a una emulsión se observa un mayor subenfriamiento debido a que el azúcar interfiere con la nucleación y retrasa la formación de los cristales de hielo. En estos ensayos se midió la entalpía de fusión del hielo formado mostrando una menor formación de hielo debido a la presencia del crioprotector. A la máxima concentración de sacarosa utilizada (2,5% p/p en la emulsión final) se observó una reducción adicional del subenfriamiento  $\approx -2^{\circ}\text{C}$  en tanto que la reducción en la formación de hielo debido a la presencia de sacarosa se encuentra en el rango 10-15%. En los ensayos de congelamiento analizados en este trabajo, debido a la baja velocidad de enfriamiento y a las amplias oscilaciones térmicas, estas diferencias entre muestras sin y con crioprotectores no resultan significativas, pudiendo asumir que los cambios que analizaremos se deben exclusivamente al almacenamiento.

## **7.2 Estudios de crioprotección a tiempos cortos de almacenamiento congelado**

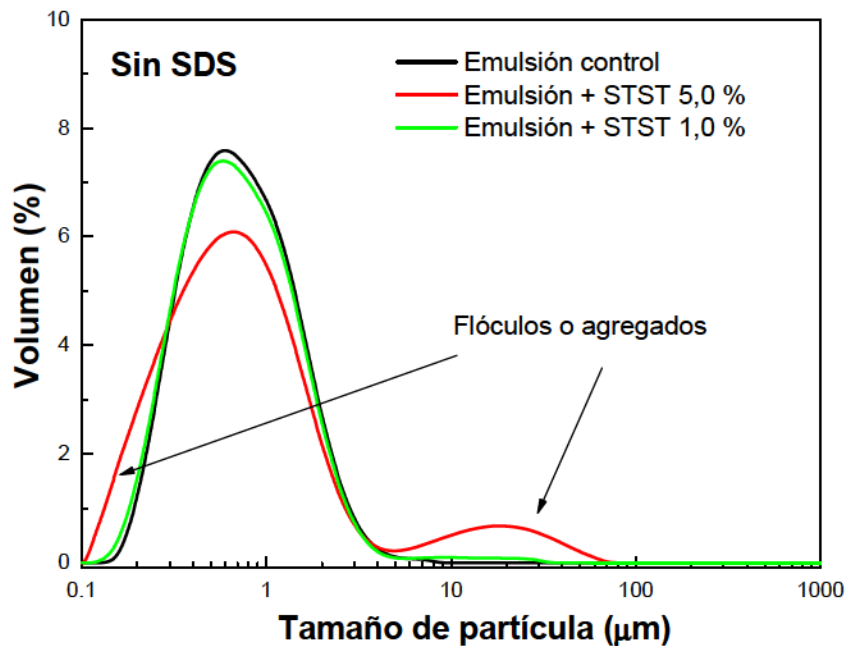
### **7.2.1 Ensayos con emulsiones de caseinato de sodio**

Sobre las emulsiones sin congelar y sobre aquellas sometidas al proceso de congelación-descongelación (CD) se determinó la DTP y a partir de los parámetros obtenidos se calculó: GF%, GC% midiéndose de forma independiente el AS%.

## *Efecto crioprotector de sueros*

*Emulsiones CS iniciales no congeladas:* En las emulsiones preparadas con CS no se detecta aceite separado en la emulsión inicial indicando que, el film interfacial formado durante la homogeneización, es capaz de retener la totalidad del aceite incorporado. El aceite incorporado en la emulsión se encuentra emulsificado formando gotas con un rango de diámetros comprendidos entre 0,1 y 2,0  $\mu\text{m}$ .

En la emulsión inicial de CS no se observan modificaciones en las DTP cuando se agrega sacarosa a todos los niveles equivalentes ensayados (sacarosa 0,3; 0,5; 1,67 o 2,5% p/p), SSL en los dos niveles analizados (1,0 o 5,0%) o STST al 1,0% p/p sin diferencias cuando las medidas fueron realizadas en ausencia y presencia de SDS, lo cual indica la ausencia de flóculos (Figura 43).



**Figura 43:** Distribución de tamaño de partícula de la emulsión caseinato de sodio (CS) control (sin crioprotector) y con agregado de suero de tofu secado térmicamente (STST). Se indican las concentraciones de STST utilizadas en la emulsión final.

Los valores de  $D_{3,2}$  y  $D_{4,3}$  para las emulsiones CS fueron de  $0,54 \pm 0,01$  y  $0,81 \pm 0,02$   $\mu\text{m}$ , respectivamente, resultados concordantes con los obtenidos en trabajos previos (Palazolo y Wagner, 2007). Se toma como control a la emulsión sin crioprotector no congelada y como referencia a la emulsión congelada.

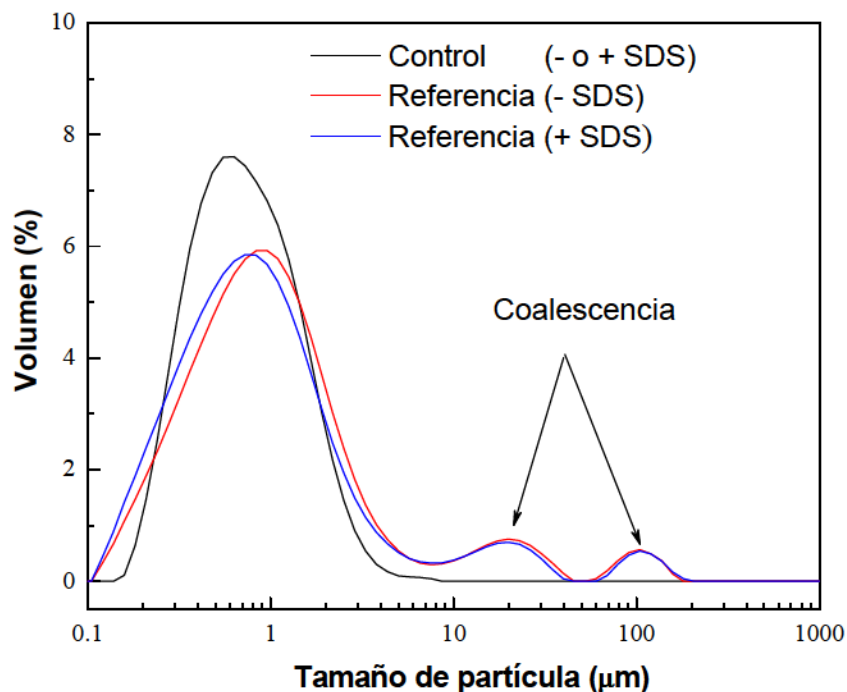


## *Efecto crioprotector de sueros*

El agregado del STST al 5,0% p/p sobre la emulsión CS produce no solo la aparición de un hombro en el rango 7-70  $\mu\text{m}$  (Figura 43), sino que además se observa otra población de partículas en el rango submicrónico menores a 0,2  $\mu\text{m}$ . En presencia de SDS las emulsiones CS a las que se agrega STST al 1,0 y 5,0% p/p dan valores de  $D_{4,3}$  de  $0,85 \pm 0,01$  y  $2,40 \pm 0,88$   $\mu\text{m}$  respectivamente. El incremento en el  $D_{4,3}$  para esta última respecto de la emulsión control rondó el 200%. Estas diferencias son atribuidas tanto a la presencia de flóculos como de agregados insolubles.

*Emulsiones CS congeladas durante 1,5 a 28 días:* Para la emulsión CS referencia se observa un aumento de la coalescencia durante el almacenamiento (entre 1,5 y 28 días). Los porcentajes de C% son 40,6; 56,4 y 462,7% para 1,5; 7 y 28 días respectivamente.

Luego de 28 días de almacenamiento congelado (Figura 44) el pico mayoritario de partículas se desplaza levemente hacia menores diámetros en presencia del agente defloculante, resultado consistente con la presencia de flóculos.



**Figura 44:** Distribución de tamaño de partícula de la emulsión caseinato de sodio control (sin congelar) y de las emulsiones tomadas como referencia sometidas a un almacenamiento congelado a  $-18^{\circ}\text{C}$  durante 28 días. Se indica si la medida fue realizada en ausencia (- SDS) o presencia (+ SDS) de detergente.

## *Efecto crioprotector de sueros*

Pese a ello, la emulsión descongelada, no evidencia separación gravitacional y el AS% es  $<1,0$ . Las emulsiones sometidas al almacenamiento congelado también presentan una población de partículas en el rango sub-micrónico (entre 0,1 y 0,2  $\mu\text{m}$ ) no observado en la emulsión sin congelar. La presencia de partículas en este rango podría atribuirse a la insolubilización de sub-micelas no adsorbidas por efecto de la congelación.

Cabe mencionar que durante el proceso de congelación, el agua cristaliza y se produce consecuentemente la crioconcentración de los componentes en la fase acuosa con un notable incremento de la fracción másica de fase dispersa en la fase acuosa no congelada lo que favorece la agregación de las gotas (McClements, 2004). En la solución crioconcentrada la concentración de sales puede incrementarse hasta 10 veces (y la fuerza iónica aún más), reduciendo el apantallamiento de las interacciones electrostáticas repulsivas entre gotas. Lo que induce procesos de agregación que pueden conducir finalmente en la coalescencia de la emulsión (Ghosh y Coupland, 2008).

En estos ensayos la fracción másica de fase dispersa usada fue relativamente baja razón por la cual el estrés asociado a la cristalización de hielo no tiene un efecto tan marcado. En forma comparativa emulsiones de caseinato preparadas a la misma concentración de muestra (2% p/p) y  $\phi_m$  similar, pero utilizando *n*-hexadecano como fase dispersa en vez de aceite refinado de girasol mostraron una alta estabilidad, sin separación de fase dispersa, aunque en dicho caso el tiempo de almacenamiento congelado fue significativamente menor (Ghosh y col., 2006).

Luego del proceso de congelación y un almacenamiento congelado de 28 días a  $-18^\circ\text{C}$  la emulsión congelada exhibe desestabilización, debido a la aparición de dos poblaciones minoritarias de partículas en los rangos de tamaño 10-40 y 70-200  $\mu\text{m}$  (Figura 44). Estas poblaciones permanecen cuando la DTP se mide en presencia de SDS, por lo que corresponderían a gotas más grandes debido a la coalescencia.

El agregado de crioprotectores tiene como finalidad reducir la desestabilización sufrida durante los procesos de congelación y almacenamiento congelado. Como vimos durante el almacenamiento la desestabilización es por coalescencia. Los valores de coalescencia de las emulsiones CS con o sin el agregado de crioprotectores a diferentes tiempos de almacenamiento se encuentran en la Tabla 43.

Respecto a la emulsión CS control el agregado de ambos sueros ensayados (STST o SSL) en cantidades másicas iguales o de sacarosa en concentraciones equivalentes produce los

## *Efecto crioprotector de sueros*

siguientes efectos: i) La adición de ambos sueros deshidratados o de sacarosa estabiliza las emulsiones frente a la coalescencia durante el almacenamiento congelado (Tabla 43); ii) la C% de las emulsiones conteniendo cualquiera de los crioprotectores es significativamente menor ( $p < 0,05$ ; Tabla 43) que el valor alcanzado por la referencia; iii) el AS% fue  $< 1,0$  para todas las emulsiones, independientemente de la concentración y el tipo de crioprotector ensayado.

Los resultados indican que, para un dado crioprotector y concentración ensayada, la C% presenta una clara tendencia: aumenta con el tiempo de almacenamiento congelado. La aparente disminución para el caso de SSL 5,0% se encuentra dentro del error experimental.

**Tabla 43:** Coalescencia hallada para las emulsiones caseinato de sodio congeladas sin crioprotector (referencia) y con el agregado de diferentes crioprotectores. Se indican los tiempos de almacenamiento a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Las concentraciones de sacarosa equivalentes fueron ubicadas debajo de cada suero.

Crioprotector	Tiempo de almacenamiento congelado (días)		
	1,5	7	28
Referencia	$40,59 \pm 6,94^a_1$	$56,42 \pm 3,50^a_2$	$462,72 \pm 13,96^a_3$
STST 1,0%	$24,13 \pm 6,08^b_1$	$27,95 \pm 2,41^b_1$	$80,50 \pm 1,91^b_2$
Sacarosa 0,3 %	$8,23 \pm 2,96^c_1$	$11,10 \pm 3,09^c_1$	$43,64 \pm 4,27^c_2$
STST 5,0 %	$29,19 \pm 9,10^{ab}_1$	$35,75 \pm 2,91^d_1$	$92,34 \pm 38,33^b_2$
Sacarosa 1,67 %	$5,30 \pm 2,18^c_1$	$7,29 \pm 2,93^{c,e}_{1,2}$	$9,85 \pm 3,09^d_2$
SSL 1,0%	$7,11 \pm 1,20^c_1$	$8,10 \pm 1,98^{c,e}_1$	$15,21 \pm 1,20^e_2$
Sacarosa 0,5%	$6,36 \pm 1,88^c_1$	$7,29 \pm 1,94^{c,e}_1$	$20,88 \pm 2,33^f_2$
SSL 5,0%	$5,29 \pm 1,84^c_1$	$4,49 \pm 1,82^e_1$	$3,68 \pm 1,06^g_1$
Sacarosa 2,5%	$4,11 \pm 1,96^c_1$	$5,30 \pm 1,84^e_1$	$5,85 \pm 1,09^h_1$

Letras superíndice diferentes indican valores medios significativamente diferentes en una misma columna; números subíndice diferentes en una misma fila indican valores medios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Si comparamos el desempeño de los sueros vemos que los incremento en la C% solo llegan a ser significativamente superiores luego de 28 días de almacenamiento para ambas

## *Efecto crioprotector de sueros*

concentraciones de STST o cuando se agrega SSL al 1,0%, ( $p < 0,05$ ; Tabla 43). No se observan cambios significativos en la C% empleando 5,0% de SSL.

Cuando se analiza el efecto de la concentración sobre la C% durante el almacenamiento se observa, para el caso de la sacarosa que un incremento en la concentración se traduce en una menor coalescencia. Entre 1,5 y 7 días de almacenamiento congelado, la sacarosa resulta mejor crioprotector que el STST logrando niveles de C% significativamente menores que los respectivos valores alcanzados con concentraciones equivalentes del suero industrial. Es más un incremento en la concentración del STST se traduce en un aumento de la C% de manera significativa luego de 7 días de almacenamiento congelado ( $p < 0,05$ ; Tabla 43). Por el contrario en ese mismo período de tiempo de almacenamiento congelado los niveles de C% resultan comparables entre sacarosa y SSL para ambos niveles ensayados.

Esta tendencia se confirma luego de 28 días de almacenamiento, siendo los valores de C% con el STST comparables entre sí y significativamente mayores a los obtenidos con concentraciones equivalentes de sacarosa. Por el contrario el SSL se desempeña mejor que la sacarosa dando -con ambos niveles de SSL- valores de C% significativamente menores a los obtenidos con cantidades equivalentes de sacarosa ( $p < 0,05$ ; Tabla 43).

Comparando los sueros entre sí para todos los tiempos de almacenamiento y concentraciones ensayadas hallamos que, los niveles de C% obtenidos con SSL resultan significativamente menores respecto a los obtenidos con iguales niveles de STST.

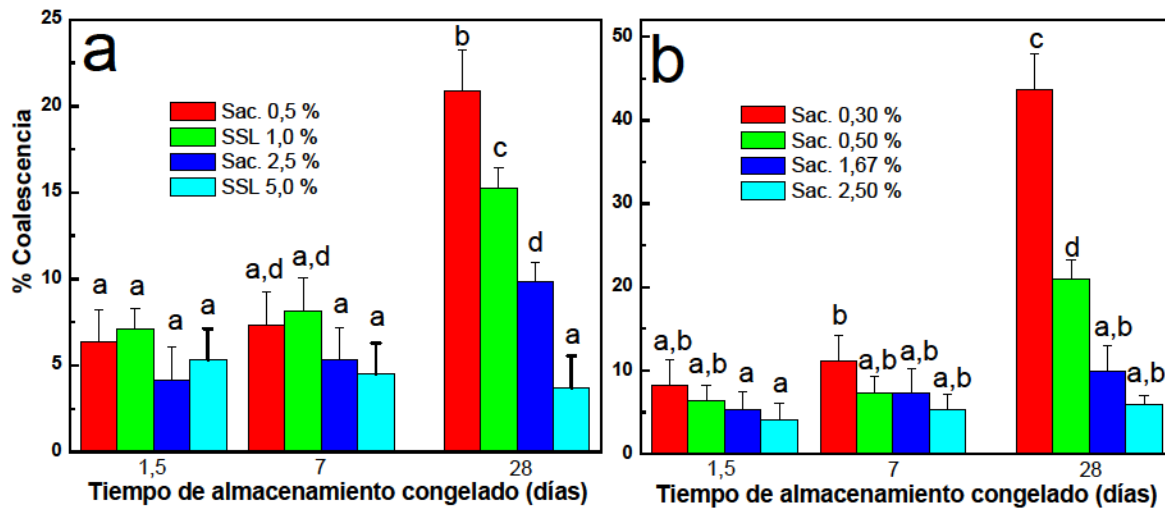
Cabe mencionar que, los tres crioprotectores ensayados (STST, SSL y sacarosa) fueron inicialmente disueltos en buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7,0. En todos los casos el tiempo de solubilización creció con la concentración, siendo la sacarosa la que se solubilizó con mayor facilidad, seguida del SSL y el STST. La menor solubilidad de este último puede atribuirse tanto a diferencias composicionales como a los tratamientos térmicos requeridos para su obtención.

Sin embargo el poder crioprotector en la emulsión depende no solo de la solubilidad en el buffer sino de la capacidad de integrarse a la emulsión lo cual es función de la habilidad del crioprotector de interactuar con la proteína formadora de la emulsión. Los resultados muestran que el STST no es incorporado por la emulsión CS de manera eficaz, produciendo un notable incremento en los valores de  $D_{4,3}$  lo que además, se traduce en una mayor dispersión entre los replicados (Tabla 43).



## Efecto crioprotector de sueros

La Figura 45a detalla los porcentajes de coalescencia hallados en emulsiones CS a las que se agregó SSL o cantidades equivalentes de sacarosa como crioprotector luego de diferentes tiempos de almacenamiento congelado. Se observa que, en la medida que se aumenta la cantidad de crioprotector utilizado disminuye el grado de coalescencia. Aunque inicialmente (1,5 días de almacenamiento) la sacarosa tiene un desempeño comparable a cantidades equivalentes de SSL, luego de 28 días de almacenamiento los resultados son evidentes: el SSL produce una mayor reducción de la coalescencia respecto a niveles equivalentes de sacarosa y utilizando 5,0% de SSL la coalescencia luego de 28 días resulta comparable a la hallada al comienzo del almacenamiento.



**Figura 45:** Porcentajes de coalescencia hallados en emulsiones caseinato de sodio almacenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$  a) Con suero de soja liofilizado (SSL) o sacarosa (Sac.) equivalente. b) Con diferentes niveles de sacarosa. Letras diferentes sobre las barras indican valores medios significativamente diferentes entre muestras

En la Figura 45b se muestran los resultados obtenidos con diferentes concentraciones de sacarosa. Los resultados indican que la coalescencia aumenta con el tiempo de almacenamiento y se reduce con el aumento en la concentración de sacarosa.

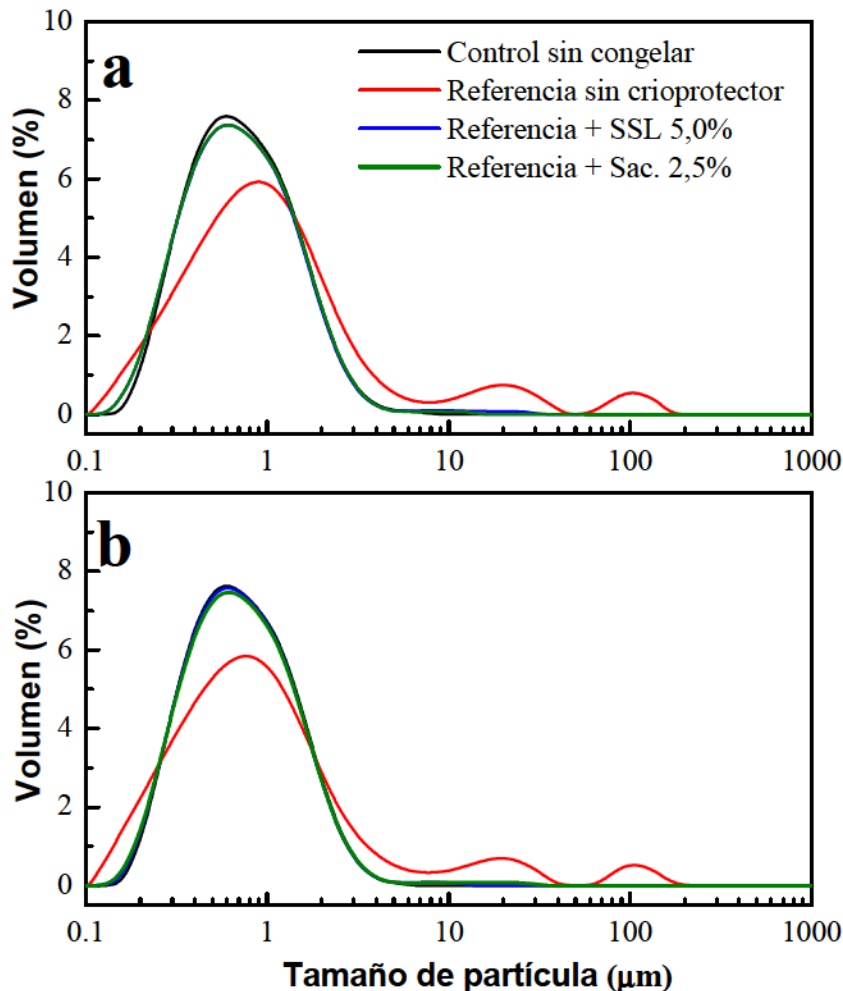
El incremento en las diferencias con el tiempo de almacenamiento sienta las bases para confirmar estos hallazgos con ensayos de almacenamiento a tiempos más largos. Adicionalmente la menor solubilidad del STST sugiere que sería conveniente la inclusión de una menor concentración para el caso del STST.

En la Figura 46 se muestran las DTP de emulsiones de CS medidas con y sin SDS luego de 28 días a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Se puede observar que el SSL tiene un efecto positivo sobre la estabilidad de la

## *Efecto crioprotector de sueros*

emulsión, ya que inhibe la formación de partículas grandes que se observan en la referencia congelada sin crioprotector.

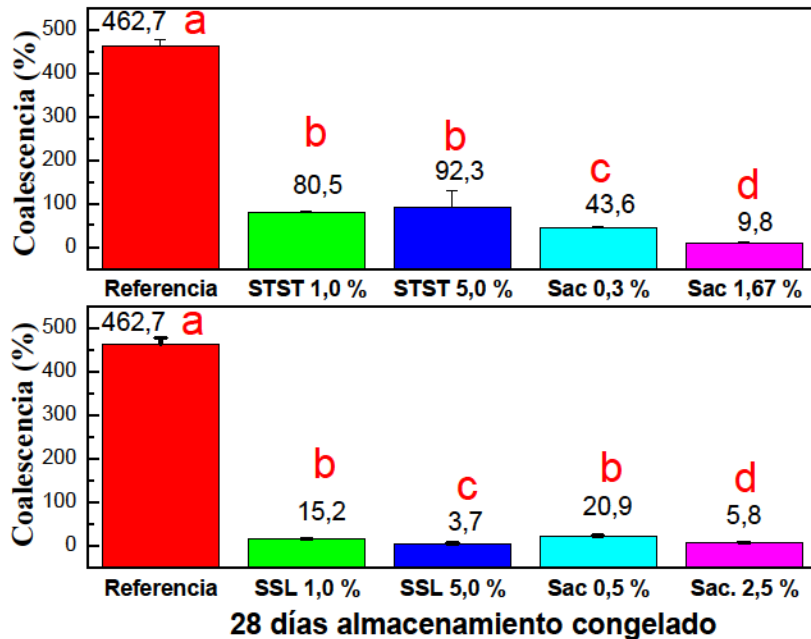
La DTP de la emulsión conteniendo SSL resulta similar a la de sacarosa, ya que ambas exhiben un único pico en un rango de diámetros de partícula similar al de la emulsión control (Figura 46a). Además, los crioprotectores parecen haber inhibido la formación de partículas en el rango submicrónico (0,1-0,2  $\mu\text{m}$ ) que aparecen en la referencia congelada sin crioprotector y que se atribuirían a partículas insolubles de caseinato formadas durante el almacenamiento congelado. En presencia de SDS, las DTP resultan similares a las medidas en ausencia del detergente, acorde a la ausencia de flóculos en la emulsión (Figura 46b).



**Figura 46:** Distribuciones de tamaño de partícula (DTP) de emulsiones caseinato de sodio congeladas durante 28 días sin crioprotector, con SSL (5,0% p/p) o con sacarosa (2,5% p/p). Las DTP se midieron en ausencia a) y presencia b) de 1,0% p/v de SDS. Con fines comparativos, también se incluyó la DTP del control sin congelar. Las abreviaturas son las de la Figura 45.

## Efecto crioprotector de sueros

Los porcentajes de coalescencia (C%) luego de 28 días de almacenamiento congelado obtenidos para las emulsiones CS con STST, SSL o cantidades equivalentes de sacarosa se muestran en la Figura 47.



**Figura 47:** Porcentajes de coalescencia (C%) de emulsiones CS almacenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$  durante 28 días (Referencia) en ausencia de crioprotectores, con STST, SSL y niveles equivalentes de Sac. Las abreviaturas son las de las Figuras 43 y 45. Los valores de C% se hallan sobre cada barra. Letras diferentes sobre las barras indican valores medios significativamente diferentes entre muestras

Para poder comparar se toma como referencia a la emulsión (sin crioprotector) congelada durante el mismo tiempo. El desempeño del STST es significativamente inferior (mayores valores de coalescencia) respecto al hallado para niveles equivalentes de sacarosa ( $p < 0,05$ ; Figura 47a). Debido a la menor solubilidad del STST las diferencias con sacarosa resultan menores a bajas concentraciones. La relación  $C\%(\text{STST})/C\%(\text{sacarosa equivalente})$  disminuye de 9,4 a 1,8 al bajar la concentración de STST del 5,0 al 1,0% respectivamente.

Los resultados muestran que SSL tiene un desempeño como crioprotector significativamente mayor respecto a cantidades máxicas iguales de STST o concentraciones equivalentes de sacarosa ( $p < 0,05$ ; Figura 47). Las mayores diferencias se obtienen a la mayor concentración en la que los valores para C% son  $3,68 \pm 1,06$  y  $5,85 \pm 1,09\%$  para SSL y sacarosa respectivamente.

## *Efecto crioprotector de sueros*

Al igual que las sales, los azúcares pueden modificar la cantidad de hielo formado en una emulsión sometida a congelación. Cuando las emulsiones son congeladas en ausencia de crioprotector, se observa desestabilización, principalmente por coalescencia aunque la magnitud de la desestabilización no fue la suficiente como para producir liberación de aceite (“*oiling off*”), acorde al valor muy bajo de AS% (<1,0) registrado para la emulsión tomada como referencia. La adición de azúcares, aún en pequeñas cantidades, puede incrementar significativamente la estabilidad de una emulsión frente a la congelación.

Ghosh y col. (2006) observaron que, el porcentaje de aceite separado en emulsiones de *n*-hexadecano estabilizadas con caseinato de sodio disminuyó del 27,0 al 2,0% al incrementar el contenido de sacarosa de 0 a 2,0% p/p. Palazolo y Wagner (2007) observaron una tendencia similar en emulsiones preparadas con diferentes muestras proteicas (aislados de soja y caseinato de sodio), utilizando glucosa y sorbitol como crioprotectores. En ambos estudios, la fracción volumétrica (o másica) fue superior al de las emulsiones utilizadas en estos ensayos de corto tiempo de almacenamiento congelado.

Se han postulado distintos mecanismos para la crioprotección ejercida por un azúcar. Los azúcares incrementan la fracción de agua no congelable, y por lo tanto, el volumen de fase acuosa disponible para que las gotas ocupen durante la congelación. El incremento del volumen de fase acuosa, reduce los efectos negativos debidos a la crioconcentración. Por otro lado, las moléculas de azúcares pueden formar enlaces de hidrógeno con las moléculas de proteína adsorbida previniendo la deshidratación del film interfacial. Adicionalmente y debido a esta tendencia a interactuar con las moléculas de proteína adsorbidas, los azúcares pueden incrementar su estabilidad conformacional, reduciendo la tendencia a la agregación (Carvajal y col., 1999). Finalmente las moléculas de azúcar, son capaces de alterar el tamaño y la morfología de los cristales de hielo formado en las emulsiones congeladas. Como consecuencia de ello, los cristales formados podrían tener menor tendencia a producir la ruptura del film interfacial que rodea a las gotas (Hartel, 2001).

Cabe mencionar que el SSL no solo contiene azúcares (principalmente sacarosa, estaquiosa y rafinosa) sino también las proteínas del suero, los inhibidores de tripsina (ITK e ITBB) y la hemaglutinina o lectina, que permanecen solubles durante la precipitación isoeléctrica de las globulinas de reserva (Sorgentini y Wagner, 1999). Como las dispersiones conteniendo estos



componentes son agregadas a la emulsión ya preparada es posible que, algunas de ellas, queden junto a una parte del CS como proteínas no adsorbidas en la fase acuosa.

Ghosh y col. (2006) observaron que la estabilidad de emulsiones de caseinato de sodio frente a la congelación se incrementó al aumentar el porcentaje de proteína no adsorbida, manteniendo constante la fracción másica de fase dispersa. Es poco probable que el efecto sea atribuido a una disminución de la cantidad de hielo debido a que las proteínas tienen un peso molecular elevado en relación a los azúcares, de esta manera las moléculas no adsorbidas de proteína entre la superficie de dos gotas podrían promover una interacción estérica repulsiva de corto rango, que evitaría que las gotas interaccionen, lo que aumentaría la estabilidad frente a la coalescencia (Ghosh y col., 2006).

### **7.2.2 Ensayos con emulsiones de aislado nativo de soja**

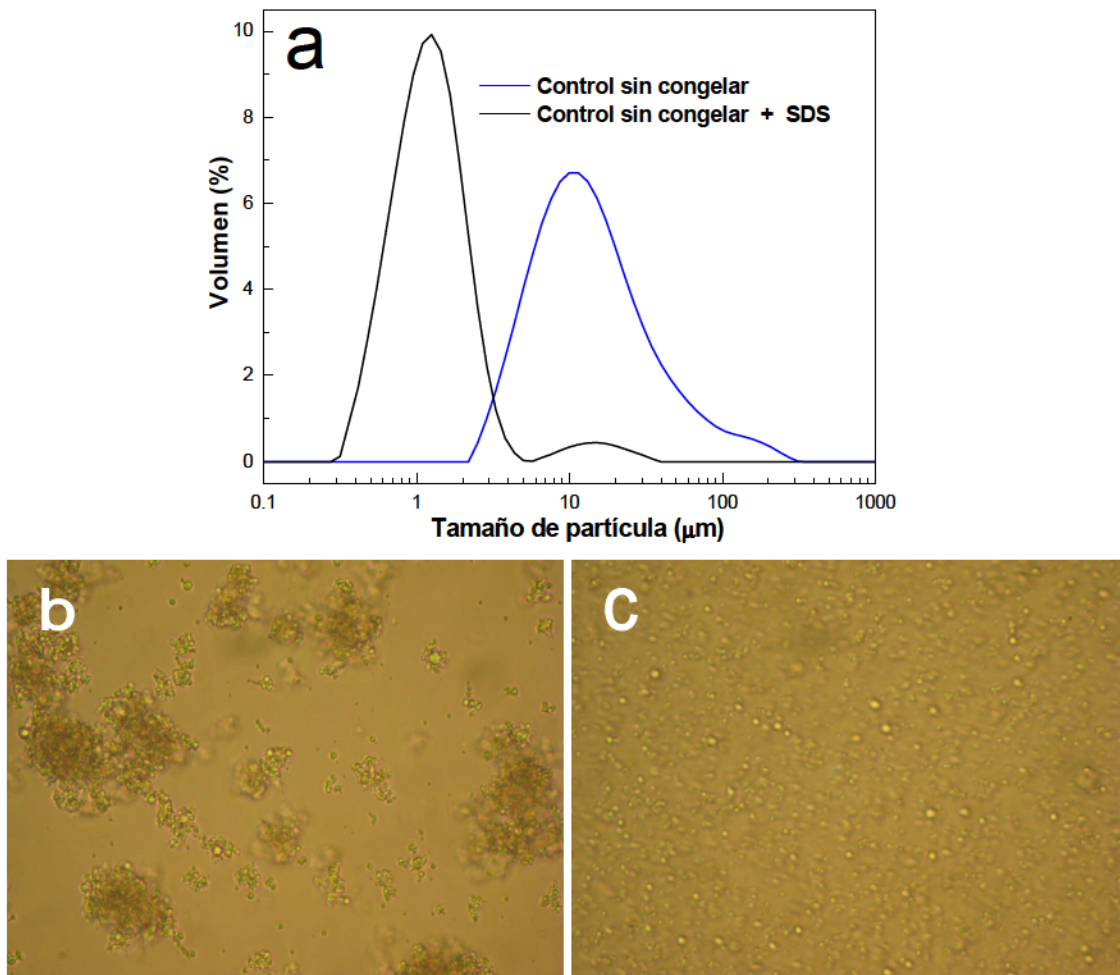
*Emulsiones ASN iniciales no congeladas:* La emulsión inicial no congelada preparada con ASN al 2,0% p/p en buffer fosfato y aceite refinado de girasol ( $\phi_m = 0,33$ ) se caracteriza por su elevada viscosidad. En la emulsión inicial no se encuentra aceite libre, lo que demuestra que el film interfacial formado durante la homogeneización es capaz de retener en forma efectiva el aceite incorporado en la emulsión. Esta emulsión inicial no congelada en ausencia de SDS (Figura 48a) exhibe un comportamiento bimodal caracterizado por la presencia de dos poblaciones superpuestas en el rango de 2-200  $\mu\text{m}$  con valores de  $D_{3,2}$  y  $D_{4,3}$  de  $8,90 \pm 0,77$  y  $19,45 \pm 2,21$   $\mu\text{m}$ , respectivamente.

La micrografía de esta emulsión inicial sin SDS (Figura 48b) muestra la presencia de gran cantidad de flóculos y de gotas no asociadas. Los resultados se corresponden con la presencia de una gran cantidad de flóculos estables en las condiciones de medida, los cuales fueron formados por el mecanismo de puenteo (Thanasukarn y col, 2004a).

Posteriormente se agrega SDS para desplazar las proteínas de la interfase e inducir la repulsión electrostática entre las gotas debido a la carga negativa (Smulders y col., 1999), lo cual produce la eliminación de los flóculos que se evidencia mediante el análisis por difracción y por el cambio en el aspecto microscópico. La DTP de la emulsión ASN con SDS se vuelve monomodal y exhibe una DTP caracterizada por una única población de partículas con un  $D_{4,3}$  en presencia del detergente de  $1,73 \pm 0,01$   $\mu\text{m}$  (Figura 48a). En la Figura 48c se confirman

## *Efecto crioprotector de sueros*

estos resultados al observar que en presencia de detergente se desarman los flóculos adoptando un aspecto más homogéneo.



**Figura 48:** a) Distribución de tamaño de partícula (DTP) de la emulsión control ASN 2,0% p/p con y sin SDS. b-c) Micrografías ópticas (400 $\times$ ) de la emulsión control ASN sin congelar. b) Sin SDS. c) Con SDS.

El ASN está formado por las globulinas de almacenamiento 7S ( $\beta$ -conglucina) y 11S (glicina) de alto PM las cuales tienen una compleja estructura cuaternaria (Yamauchi y col., 1991), teniendo esta última la capacidad de agregarse en condiciones de alta fuerza iónica. Por ello, durante la etapa de homogeneización a alta presión la adsorción de los agregados proteicos sobre las gotas de aceite formadas (nueva interfase) puede llegar a ser el proceso que determine la velocidad de formación de flóculos por el mencionado mecanismo de puenteo. Las emulsiones preparadas con altas concentraciones de proteínas (3,0% p/p en condiciones de fuerza iónica similares) también resultaron flocculadas (datos no mostrados).

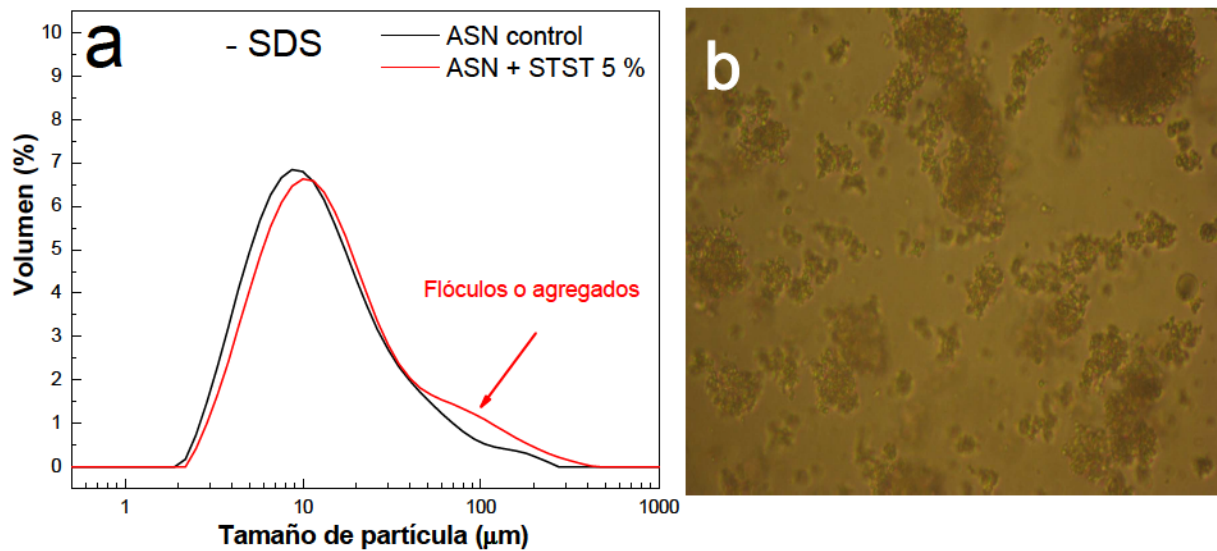
## *Efecto crioprotector de sueros*

Por lo dicho, la concentración de emulsificante no resulta limitante durante el proceso de homogeneización ya que existe cantidad suficiente de proteína para cubrir la interfase formada. Emulsiones conteniendo ASN no floculadas fueron obtenidas de manera eficiente cuando la preparación se realizó en condiciones de baja fuerza iónica utilizando la misma concentración de proteína, presión de homogeneización en las válvulas y la misma fracción másica de aceite (Palazolo y col., 2011). Este hecho refleja el notable efecto de la alta fuerza iónica sobre la capacidad de agregación de las gotas de las emulsiones estabilizadas con ASN.

El agregado de SSL (1,0 o 5,0% p/p) o cantidades de sacarosa (0,3; 0,5; 1,67 o 2,5% p/p de sacarosa) no producen cambios en las DTP (datos no mostrados).

Sin embargo cuando se realiza el agregado de STST se observa un ligero aumento en los valores de  $D_{4,3}$  en la medida que se incrementa la concentración de STST. Los  $D_{4,3}$  en presencia de SDS son  $1,92 \pm 0,01$  y  $2,40 \pm 0,58$   $\mu\text{m}$  cuando se agregó 1,0 o 5,0% p/p de STST en la emulsión final, respectivamente.

Los cambios debidos al agregado de STST en ausencia de detergente se evidencian en la Figura 49.



**Figura 49:** a) Distribución de tamaño de partícula de la emulsión ASN control y con el agregado de agregado de STST al 5,0% p/p en la emulsión final. -SDS: Indica que la emulsión fue analizada en ausencia del detergente. b) Micrografías ópticas (400x) de la emulsión ASN sin SDS con STST al 5,0%.

En la Figura 49a se observan las diferencias en ausencia del detergente entre la emulsión control y con el agregado de STST a la máxima concentración. Con agregado de STST al



## *Efecto crioprotector de sueros*

5,0% se observa un pequeño hombro ubicado en la zona de 100  $\mu\text{m}$  lo que se traduce en el incremento en el valor de  $D_{4,3}$ .

Debido a la naturaleza de los componentes que forman la emulsión así como a la presencia de fibra, proteínas y calcio aportado mayormente por el STST se postula que este hombro podría ser atribuido a partículas insolubles que forman agregados o flóculos de tamaño variable. El comportamiento diferencial observado entre las emulsiones CS y ASN cuando se agregó STST puede atribuirse a la mayor tendencia del ASN a formar flóculos y agregados con el calcio aportado por el STST respecto de CS. La micrografía de esta emulsión corrobora estos resultados (Figura 49b).

*Emulsiones ASN congeladas durante 1,5 a 28 días:* Los trabajos de congelación realizados con este tipo de emulsiones muestran que, las mismas son muy inestables a los procesos de CD. Por esta razón se decidió analizar primero los cambios ocurridos tras un breve almacenamiento congelado y posteriormente analizar los cambios producidos durante un almacenamiento más prolongado.

La emulsión ASN referencia (sin crioprotector) sometida a un proceso de CD y almacenada a  $-18^{\circ}\text{C}$  durante un breve período de tiempo (1,5 días) se desestabiliza marcadamente. En las DTP sin o con SDS se encuentra una población de partículas de diámetros mayores a 100  $\mu\text{m}$ , lo cual indica un avanzado proceso de coalescencia (Figura 50). Los  $D_{4,3}$  hallados para esta emulsión son  $44,18 \pm 3,37$  y  $141,98 \pm 8,12$   $\mu\text{m}$  con y sin SDS respectivamente.

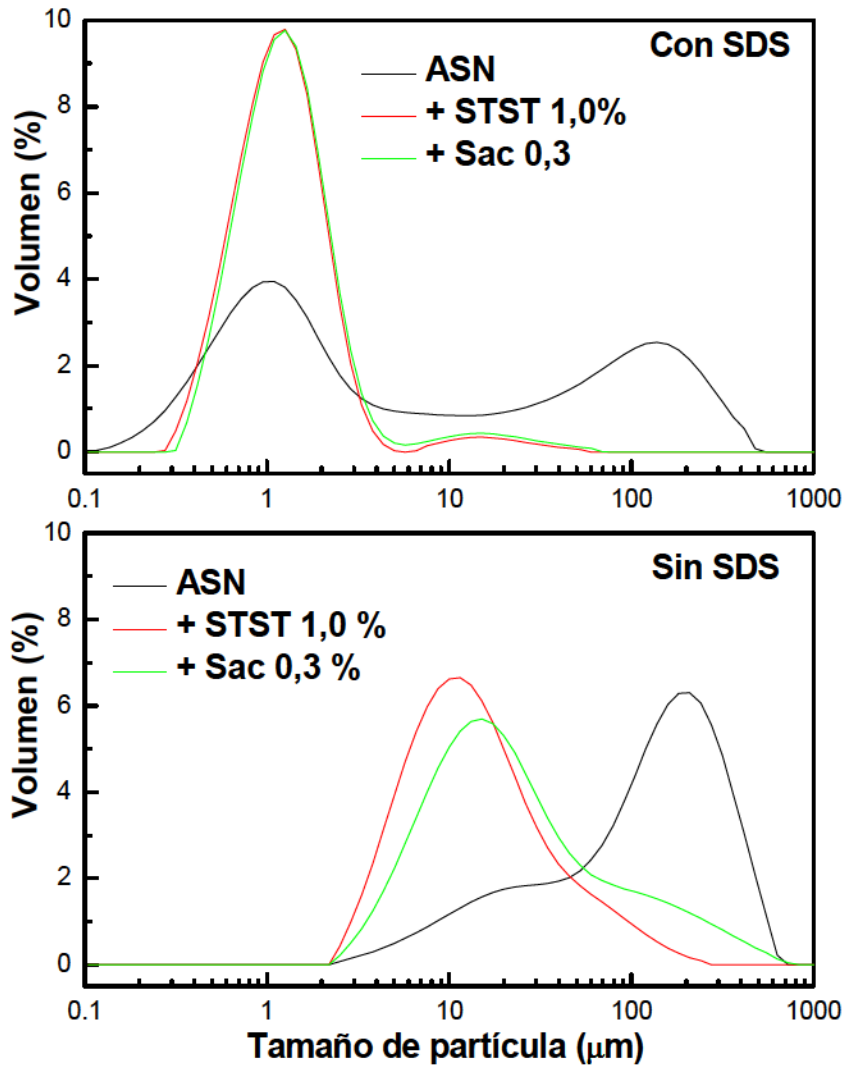
En las emulsiones congeladas las interacciones entre gotas se incrementan notablemente, particularmente en aquellas que forman flóculos, por esto es esperable un alto valor de coalescencia en emulsiones inicialmente floculadas. Este es el caso de la emulsión referencia en donde la C% luego de un almacenamiento de 1,5 días alcanza un valor de 2423,3 manteniéndose prácticamente constante durante el almacenamiento. El GF% hallado para la emulsión ASN control sin congelar es 1024,3, mientras que para la emulsión tomada como referencia es 221,3 luego de 1,5 días a  $-18^{\circ}\text{C}$ , alcanzando un valor de 210,1 luego de 28 días de almacenamiento congelado.

El elevado grado de coalescencia hallado, junto con la notable reducción en el grado de floculación y la visualización de una fase crema luego de un almacenamiento de 1,5 días demuestran que, la emulsión ASN control resulta muy inestable frente a la congelación y



## *Efecto crioprotector de sueros*

sugiere que gran parte de los flóculos presentes en la emulsión inicial se desestabilizan por coalescencia durante el almacenamiento congelado, aun a tiempos cortos.



**Figura 50:** Distribuciones de tamaño de partícula de emulsiones ASN congeladas durante 1,5 días. +: Indica el agregado del crioprotector ensayado. Las abreviaturas son las de las Figuras 43 y 45. Las concentraciones de crioprotector corresponden a las concentraciones finales en la emulsión final.

Para comprender estos resultados debe considerarse que, durante la congelación el agua forma cristales de hielo y que la mayor parte de las emulsiones o/w estabilizadas con proteínas son inestables en ausencia de crioprotectores. Hay varios efectos desestabilizantes para el caso de emulsiones o/w los cuales pueden ser agrupados en dos categorías importantes. Por un lado la formación de hielo determina la formación de una fase no congelada; dicha fase se caracteriza

## *Efecto crioprotector de sueros*

por estar concentrada en todos los solutos, lo que promueve un importante incremento en la fuerza iónica. Por otra parte, el volumen de la fase dispersa se incrementa en la medida que la cantidad de agua líquida se reduce durante el proceso de congelación. La fracción másica de aceite (o fracción volumétrica de aceite) en el estado congelado puede aproximarse a un empaquetamiento compacto para el caso de emulsiones típicas. La floculación, coalescencia y posteriormente el aceite liberado son favorecidos cuando las gotas de aceite son forzadas a aproximarse entre sí (Ghosh y Coupland, 2008; McClements, 2004; Thanasukarn y col., 2004a). En la mayor parte de las emulsiones se espera que el GF% se incremente durante el congelamiento y posterior almacenamiento congelado, sin embargo como se mencionó para estas emulsiones floculadas el mecanismo de desestabilización es mediado por coalescencia. Por ello será esperable una disminución en el GF% tras la congelación y durante el almacenamiento congelado.

El agregado de crioprotectores tiene como finalidad reducir la desestabilización sufrida durante los procesos de congelación y almacenamiento congelado. En la Figura 50a puede verse que, en las emulsiones con agregado de crioprotector, al ser congeladas y almacenadas un corto tiempo exhiben una DTP similar al de la emulsión control (Figura 48a). En ausencia del detergente y en forma comparativa con sacarosa equivalente la DTP de la emulsión conteniendo el STST se encuentra desplazada hacia la región de menor tamaño de partícula.

Luego de 1,5 días a  $-18^{\circ}\text{C}$  en ausencia del detergente los  $D_{4,3}$  hallados para las emulsiones conteniendo STST y SSL al 1,0% en la emulsión final fueron  $20,65 \pm 0,03$  y  $22,54 \pm 0,80$   $\mu\text{m}$ , respectivamente, mientras que con 5,0% los valores son  $19,77 \pm 0,05$  y  $22,20 \pm 2,58$   $\mu\text{m}$  para STST y SSL, respectivamente. Estos resultados revelan que, aumentar la concentración de un mismo suero ensayado reduce el tamaño de las gotas en las emulsiones descongeladas. En forma comparativa el STST se desempeña mejor que el SSL dando una reducción significativa del  $D_{4,3}$  al aumentar la concentración del STST del 1,0 al 5,0%.

Los datos mostrados en la Tabla 44 muestran que ambos sueros tienen un mayor poder crioprotector que sus respectivas referencias preparadas con cantidades equivalentes de sacarosa ya que utilizando los sueros se obtiene emulsiones con valores significativamente menores de  $D_{4,3}$  ( $p < 0,05$ ; Tabla 44). En forma comparativa el STST se desempeña no solo mejor que sus respectivas cantidades equivalentes de sacarosa sino mejor que el SSL (obteniendo menores valores de  $D_{4,3}$ ).

## *Efecto crioprotector de sueros*

**Tabla 44:** Valores de  $D_{4,3}$  en ausencia de SDS de emulsiones ASN conteniendo diferentes crioprotectores almacenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$  durante los tiempos que se indican. Abreviaturas de las Figuras 43 y 45. Las concentraciones de crioprotector corresponden a las concentraciones finales en la emulsión final.

Tiempo de almacenamiento (días)	Valores de $D_{4,3}$ ( $\mu\text{m}$ )			
	STST 1,0 %	Sac. 0,3 %	SSL 1,0 %	Sac. 0,5 %
1,5	$20,65 \pm 0,03^a$	$44,26 \pm 3,37^a$	$22,54 \pm 0,80^a$	$29,28 \pm 1,96^a$
7	$19,11 \pm 1,32^a$	$44,86 \pm 5,63^a$	$27,26 \pm 3,05^b$	$33,96 \pm 2,48^b$

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Se debe notar que mientras que las emulsiones con el STST alcanzan valores de  $D_{4,3}$  comparables para ambos tiempos de almacenamiento, aquellas emulsiones conteniendo el SSL como crioprotector experimentan un incremento significativo en los valores de este parámetro en la medida que el tiempo de almacenamiento congelado se incrementa ( $p < 0,05$ ; Tabla 44).

Como se mencionó, en estas emulsiones floculadas la desestabilización se caracteriza por un marcado descenso en la cantidad de flóculos iniciales. Respecto de la emulsión referencia (sin crioprotectores) el GF% se reduce en 4,63 veces luego de 1,5 días de almacenamiento congelado. Por lo dicho la efectividad de un crioprotector dado puede ser evaluada cuantificando la disminución en el GF% durante el almacenamiento congelado. Para emulsiones floculadas sometidas a congelación un crioprotector será mejor que otro en la medida que produzca una menor reducción en el GF%.

En la Tabla 45 se muestra la evolución del GF% en función del tiempo de almacenamiento congelado. Puede verse que, tras un breve almacenamiento congelado de 1,5 días, las emulsiones conteniendo cualquiera de los crioprotectores ensayados exhiben grados de floculación más elevados que la emulsión congelada durante el mismo tiempo (221,3%), indicando que el agregado de los crioprotectores reduce la disminución del GF%. La presencia de los crioprotectores no evita la formación de flóculos ni la formación de una fase crema en las emulsiones. Si se analiza el comportamiento durante el almacenamiento congelado puede verse que, cuando se utilizan crioprotectores, la floculación disminuye con el tiempo de almacenamiento congelado.

Una mayor disminución del grado de floculación se asocia con: i) un mayor grado de desestabilización de la emulsión, fundamentalmente por coalescencia; ii) la formación de una crema con un menor grado de hidratación, dando una emulsión menos estable con una mayor

## *Efecto crioprotector de sueros*

tendencia a la separación de aceite. Se postula que los crioprotectores reducirían la desestabilización por coalescencia probablemente debido a la formación de una fase crema hidratada en la que participan los flóculos.

**Tabla 45:** Evolución del GF% en función del tiempo de almacenamiento congelado para emulsiones ASN con agregado de los crioprotectores indicados. Debajo de cada crioprotector ensayado se halla el correspondiente control de sacarosa equivalente. Abreviaturas de las Figuras 43 y 45.

Crioprotector	Tiempo de almacenamiento congelado (días)			
	1,5	7	14	28
<b>STST 1,0%</b>	1125,7 ± 11,3 <sup>a</sup>	1008,3 ± 10,1 <sup>a</sup>	858,6 ± 9,2 <sup>a</sup>	551,6 ± 6,6 <sup>a</sup>
<b>Sac. 0,3 %</b>	2033,7 ± 40,7 <sup>b</sup>	1512,2 ± 30,2 <sup>b</sup>	1405,8 ± 28,1 <sup>b</sup>	840,1 ± 16,8 <sup>b</sup>
<b>STST 5,0 %</b>	534,3 ± 7,2 <sup>c</sup>	213,1 ± 3,1 <sup>c</sup>	213,1 ± 4,5 <sup>c</sup>	386,9 ± 2,8 <sup>c</sup>
<b>Sac. 1,67 %</b>	1753,2 ± 19,3 <sup>d</sup>	1303,8 ± 14,5 <sup>d</sup>	855,6 ± 6,7 <sup>a</sup>	847,9 ± 7,6 <sup>b</sup>
<b>SSL 1,0%</b>	1369,2 ± 15,2 <sup>e</sup>	1267,1 ± 13,6 <sup>e</sup>	968,3 ± 7,9 <sup>d</sup>	755,1 ± 6,8 <sup>d</sup>
<b>Sac. 0,5%</b>	1610,2 ± 33,5 <sup>f</sup>	1516,6 ± 28,6 <sup>b</sup>	870,0 ± 16,9 <sup>a</sup>	813,8 ± 13,4 <sup>b</sup>
<b>SSL 5,0%</b>	1369,2 ± 8,6 <sup>e</sup>	757,9 ± 4,5 <sup>f</sup>	767,0 ± 3,1 <sup>e</sup>	683,0 ± 5,9 <sup>e</sup>
<b>Sac. 2,5%</b>	1303,7 ± 9,3 <sup>g</sup>	1182,1 ± 11,8 <sup>g</sup>	913,9 ± 7,6 <sup>f</sup>	780,0 ± 8,5 <sup>f</sup>

Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

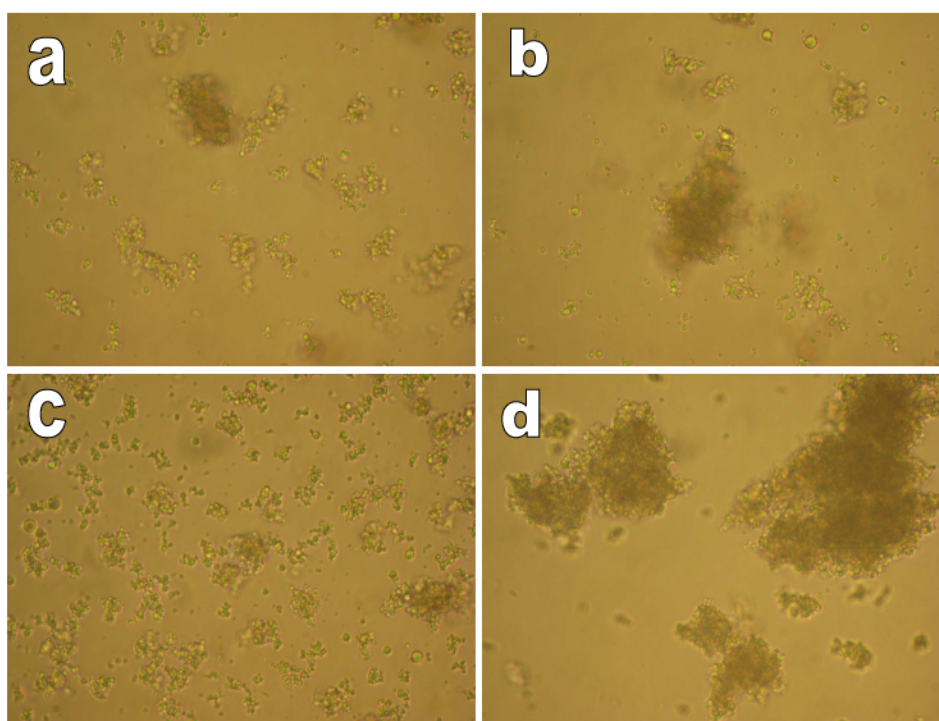
Para analizar los efectos debidos al almacenamiento se toma como referencia el grado de floculación alcanzado tras un almacenamiento congelado de 1,5 días comparando este valor con el hallado luego de 28 días. Se observa que, para el máximo tiempo de almacenamiento (4 semanas) la mayor reducción en el GF% se produce en la emulsión con sacarosa en su nivel más bajo (0,3% p/p) en donde se alcanza una reducción de 2,42 veces. Le sigue en orden decreciente la sacarosa al 0,5 y 1,67% p/p con reducciones entre 1,98-2,07, mientras que con 2,5% de sacarosa la reducción del GF% se reduce en 1,67 veces indicando que el aumento en la concentración del crioprotector mejora la estabilidad. Si se compara el desempeño de los sueros deshidratados respecto a las respectivas concentraciones equivalentes de sacarosa se encuentra que, SSL se desempeña mejor que sacarosa a la menor concentración aunque a la concentración más alta sucede lo contrario. Luego de un almacenamiento congelado de 1,5



## *Efecto crioprotector de sueros*

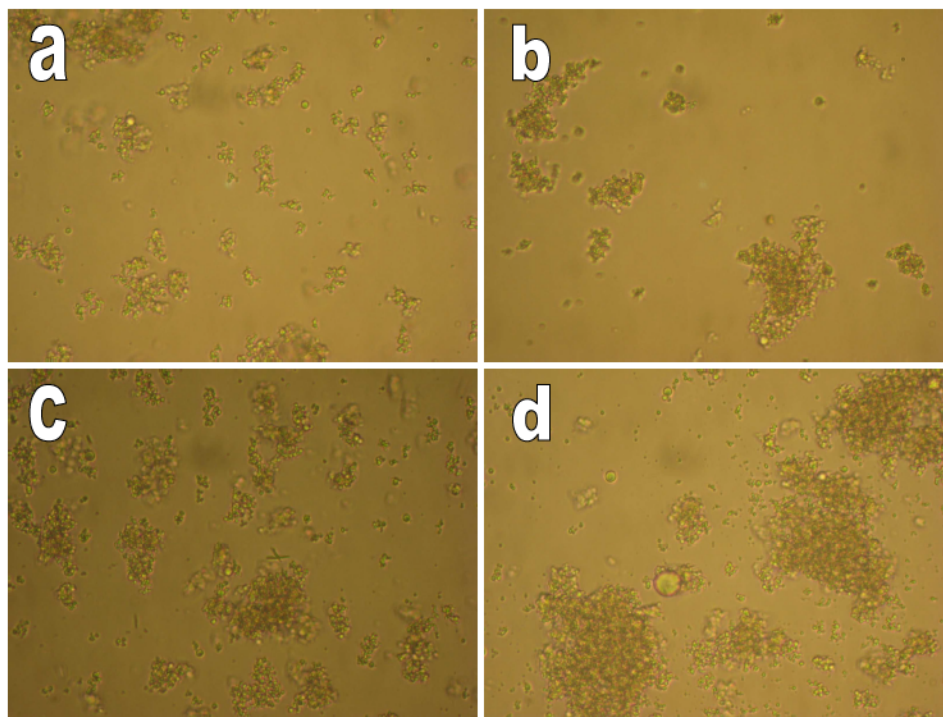
días el GF% es igual para las emulsiones con 1,0 o 5,0% de SSL. Por el contrario luego de 28 días el GF% con SSL al 5,0% es significativamente menor (referencia SSL al 1,0%) indicando que un aumento en la concentración de SSL se traduce en una menor capacidad crioprotectora ( $p < 0,05$ ; Tabla 45). Para el caso del STST se obtienen mejores resultados respecto a sacarosa equivalente en todo el rango de concentración.

En las Figuras 51-53, se muestran las micrografías de emulsiones descongeladas a diferentes tiempos sin la presencia de SDS. En ellas puede verse claramente que, para una misma concentración de crioprotector la cantidad de flóculos se reduce con el tiempo de almacenamiento congelado debido a que los mismos se desestabilizan durante el almacenamiento. Adicionalmente para un mismo tiempo de almacenamiento la cantidad de flóculos es mayor cuando la cantidad de crioprotector se reduce.

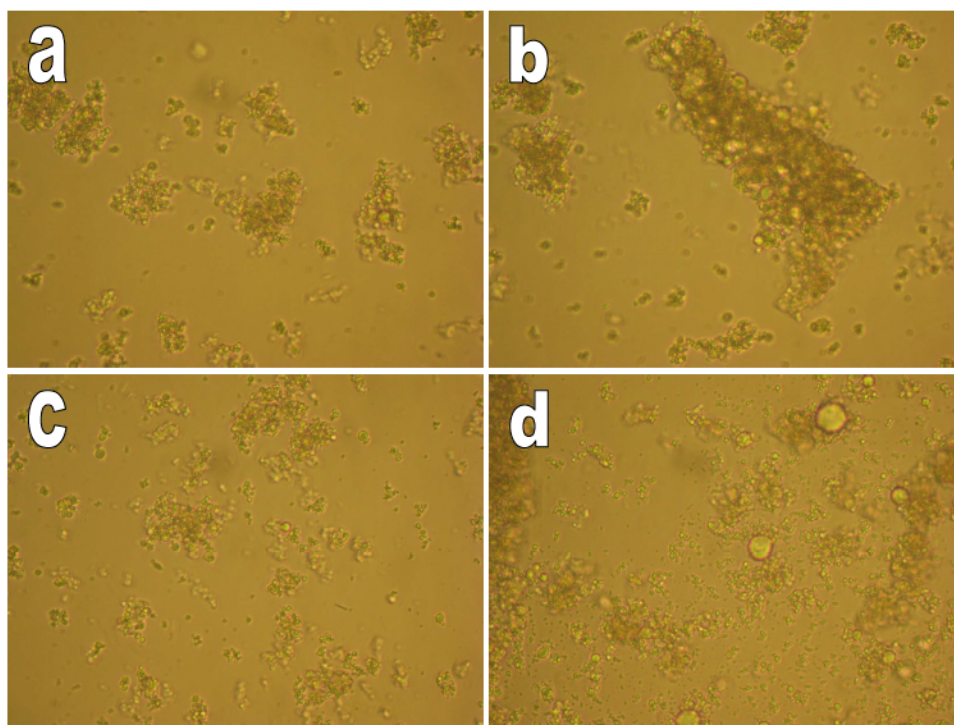


**Figura 51:** Micrografías ópticas (400×) de emulsiones ASN sin SDS congeladas durante 7 días. a) Con STST 5,0%. b) Con STST 1,0%. c) Con SSL 5,0%. d). Con SSL 1,0%. Abreviaturas de las Figuras 43 y 45.

## *Efecto crioprotector de sueros*



**Figura 52:** Micrografías ópticas (400×) de emulsiones ASN sin SDS congeladas durante 14 días. a) Con STST 5,0%. b) Con STST 1,0%. c) Con SSL 5,0%. d). Con SSL 1,0%. Abreviaturas de las Figuras 43 y 45.



**Figura 53:** Micrografías ópticas (400×) de emulsiones de ASN 2,0% p/p sin SDS congeladas durante 28 días. a) Con STST 5,0%. b) Con STST 1,0%. c) Con SSL 5,0%. d). Con SSL 1,0%. Abreviaturas de las Figuras 43 y 45.

## *Efecto crioprotector de sueros*

Para una misma cantidad de crioprotector, se encuentran reducciones en el grado de floculación con el tiempo de almacenamiento. Estas reducciones son de mayor magnitud para el SSL al 1,0% siendo lo más llamativo el cambio en el aspecto de los flóculos.

Los flóculos que a los 7 días de almacenamiento congelados son compactos y opacos al paso de la luz (Figura 51d) se muestran más abiertos y transparentes a los 14 días (Figura 52d). Finalmente tras 4 semanas de almacenamiento se observa una clara reducción tanto en la cantidad y densidad de los flóculos con la aparición de gotas de aceite libre en la emulsión con SSL al 1,0% (Figura 53d).

En la Tabla 46 se muestran los valores de coalescencia y el aceite separado luego de 28 días de almacenamiento congelado. Nótese que el STST tiene un mejor desempeño que cantidades equivalentes de sacarosa y que su performance mejora con el incremento en la concentración. Las cantidades de AS% empleando STST son comparables con sacarosa a baja concentración pero son significativamente menores a alta concentración ( $p < 0,05$ ; Tabla 46). Por el contrario el desempeño del SSL en ningún caso es mejor respecto a cantidades equivalentes de sacarosa y contrariamente a lo observado con el STST su desempeño empeora con el incremento en la concentración.

**Tabla 46:** Valores de coalescencia (C%) y aceite separado (AS%) de emulsiones ASN congeladas durante 28 días a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Abreviaturas de las Figuras 43, 45 y 47.

Emulsiones congeladas	Crioprotector (% p/p)	C (%)	AS (%)
<b>Referencia</b>	-----	2453,7	$0,26 \pm 0,01^a$
<b>STST</b>	1,0	32,1	$0,16 \pm 0,02^b$
	5,0	$\approx 0$	$0,10 \pm 0,01^c$
<b>Sac.</b>	0,3	9,7	$0,18 \pm 0,02^{b,d}$
	1,67	19,0	$0,20 \pm 0,02^d$
<b>SSL</b>	1,0	9,0	$0,17 \pm 0,03^b$
	5,0	11,7	$0,18 \pm 0,02^b$
<b>Sac.</b>	0,5	9,2	$0,17 \pm 0,02^b$
	2,5	8,5	$0,17 \pm 0,01^b$

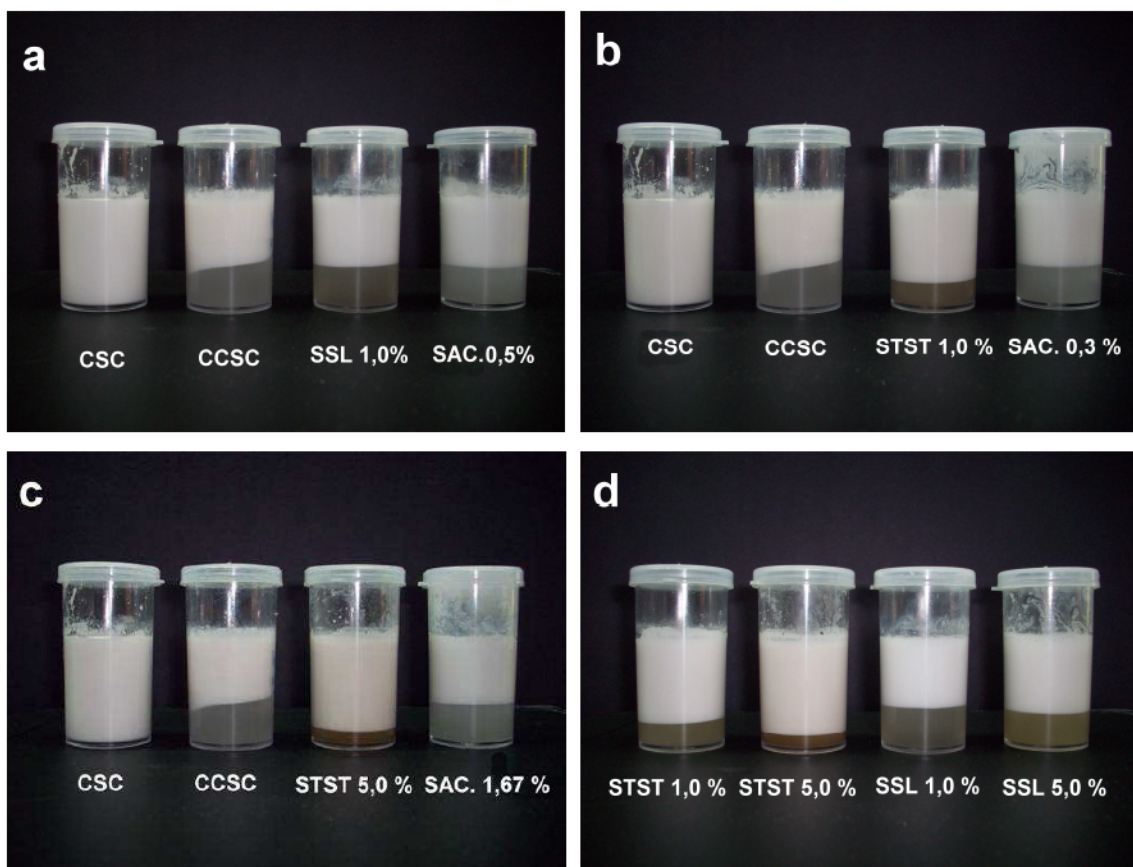
Valores medios de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



## *Efecto crioprotector de sueros*

En la Figura 54 se observan las fotos de las emulsiones ASN descongeladas a la mitad del período de almacenamiento congelado (14 días).

En las Figuras 54a-c los 2 frascos ubicados a la izquierda de la imagen corresponden a la emulsión control sin congelar (CSC) y a la emulsión referencia congelada sin crioprotector (CCSC) usada para cuantificar el efecto de los crioprotectores. Comparando ambas emulsiones resulta evidente la desestabilización experimentada por la emulsión CCSC debido al almacenamiento congelado con una clara separación de una fase crema de una fase inferior acuosa.



**Figura 54:** Fotografías de emulsiones ASN almacenadas durante 14 días a -18°C. CSC: Control sin congelar; CCSC: Control congelado sin crioprotector. Abreviaturas de las Figuras 43 y 45. En cada figura se incluye un control de sacarosa equivalente al suero analizado. Los niveles de crioprotectores están expresado como porcentaje p/p de la masa total de la emulsión.

En la Figura 54a,b se compara el desempeño de SSL al 1,0% con una cantidad equivalente de sacarosa 0,5% p/p y el de STST al 1,0% con su control equivalente de sacarosa al 0,3%. Con



SSL la cantidad de fase acuosa y el grado de hidratación de la crema formada resultan comparables a la emulsión congelada sin crioprotector tomada. Por el contrario el agregado de STST reduce la fase acuosa y permite la formación de una crema que resulta más hidratada que su correspondiente control con sacarosa.

En la Figura 54c se observa que el empleo de una mayor cantidad de STST (5,0% p/p) produce mejores resultados respecto a la emulsión congelada sin crioprotector, a su control equivalente de sacarosa (1,67% p/p) y a los resultados obtenidos con STST al 1,0% (Figura 54b). Finalmente en la Figura 54d se hace una comparación entre ambos tipos de sueros (STST y SSL) a los dos niveles ensayados. En dicha figura se observa que el incremento en la cantidad de ambos crioprotectores aumenta el grado de hidratación de la fase crema y reduce el tamaño de la fase acuosa separada tras la descongelación. Adicionalmente se observan menores diferencias entre ambos niveles de SSL y se evidencia que para ambas concentraciones el STST tiene un mejor desempeño respecto a niveles iguales de SSL.

### **7.3 Estudios de crioprotección a tiempos largos de almacenamiento congelado**

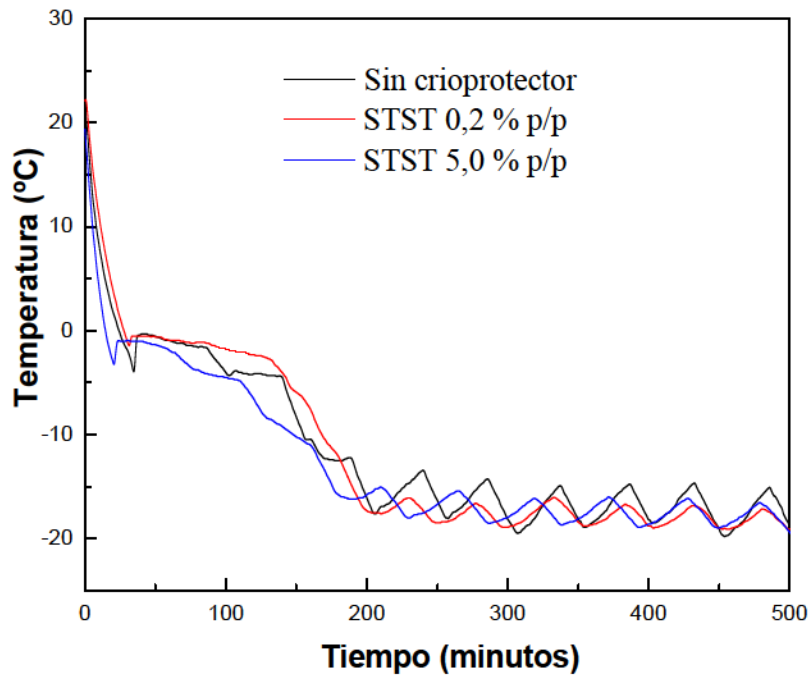
Los estudios de crioprotección realizados a tiempos cortos de almacenamiento revelaron que, en la emulsión CS el SSL resultó más efectivo como crioprotector que igual cantidad de STST o cantidades equivalentes de sacarosa. Por el contrario con ASN el STST tuvo un mejor desempeño como crioprotector superando al SSL o cantidades equivalentes de sacarosa.

Para los estudios a tiempos largos de almacenamiento se eligió este último sistema (ASN-STST) debido a que: i) las emulsiones preparadas con ASN son altamente floculadas y por lo tanto menos estables al almacenamiento congelado; ii) el empleo de STST como crioprotector resultó aún más conveniente que el SSL ya que además de permitir la incorporación de proteínas de suero glicosiladas los factores antitripticos en este suero se encuentran inactivados; iii) el aporte de calcio del STST resulta significativamente mayor al aportado por SSL. Debido a los resultados previos y a la menor solubilidad del STST, para estos ensayos se amplió el rango de concentraciones incluyendo el agregado de STST al 0,2% p/p en la emulsión final, agregándose las determinaciones analíticas detalladas en 2.15.2.

## *Efecto crioprotector de sueros*

*Cinéticas de congelamiento:* Cuando se analizaron las cinéticas de congelamiento de las emulsiones (sección 7.1) se comentó que, el agregado de crioprotectores aumenta el subenfriamiento, reduce la cantidad de hielo formado y que una vez alcanza la temperatura más baja comienzan las oscilaciones térmicas superiores a 4°C que se repiten cada 50 min.

En la Figura 55 se aprecia que el agregado de STST aún a la menor concentración ensayada (0,2% p/p en la emulsión final), reduce drásticamente la oscilación térmica de  $4,2 \pm 0,6$  (emulsión sin crioprotector) a  $2,1 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ , indicando que el crioprotector además tiene la capacidad de disminuir las oscilaciones térmicas y consecuentemente la recristalización durante el almacenamiento reduciendo la desestabilización de la emulsión.

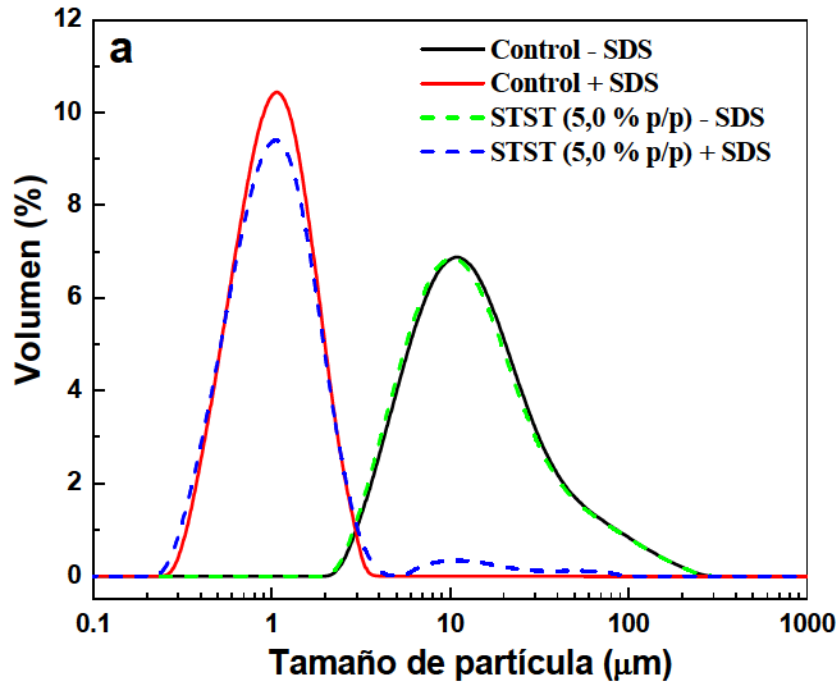


**Figura 55:** Cinéticas de enfriamiento-congelación de emulsiones ASN con agregado de STST al 0,2 y 5,0% p/p. Las temperaturas fueron medidas con termocuplas de 1 mm de diámetro del tipo K colocadas en el centro de la muestra.

Los estudios de Hartel (1996) y más recientemente de Phimosiripol y col. (2008), mostraron que, las fluctuaciones térmicas son responsables del proceso de recristalización que ocurren durante el almacenamiento en estado congelado y contribuyen a la desestabilización de las emulsiones durante el almacenamiento congelado.

## *Efecto crioprotector de sueros*

*Emulsiones ASN iniciales no congeladas:* La emulsión ASN control (sin crioprotector) resulta comparable a la analizada en 7.2.2, debido a que es altamente floclulada y posee una elevada viscosidad, presentando en ausencia de SDS un comportamiento bimodal caracterizado por la presencia de dos poblaciones superpuestas en el rango de 2-200  $\mu\text{m}$  (Figura 56).



**Figura 56:** Distribución de tamaño de partículas de emulsiones ASN control (sin crioprotector) o con el agregado de STST a las concentraciones finales que se indican. + SDS y - SDS: Indica que las medidas fueron realizadas en presencia o ausencia del detergente respectivamente.

Para esta nueva emulsión ASN se encuentran valores sin SDS de  $D_{3,2}$  y  $D_{4,3}$  de  $9,71 \pm 0,09$  y  $20,03 \pm 0,11$   $\mu\text{m}$  respectivamente comparables a los hallados para la emulsión analizada previamente ( $p < 0,05$ ; sección 7.2.2). La medida realizada con SDS para desplazar las proteínas de la interfase, inducir la repulsión electrostática entre las gotas y eliminar los flóculos durante el análisis hizo que la DTP pase a ser monomodal. En estas condiciones la DTP se caracteriza por la presencia de una única población de partículas. Los valores de  $D_{3,2}$  y  $D_{4,3}$  son de  $0,84 \pm 0,01$  y  $1,06 \pm 0,01$   $\mu\text{m}$  respectivamente.

Como en los estudios de crioprotección a cortos tiempos de almacenamiento congelado en la emulsión control no se encuentra aceite libre, lo que indica que el film interfacial formado es capaz de retener en forma efectiva el aceite incorporado en la emulsión. Las diferencias entre

## *Efecto crioprotector de sueros*

las medidas con y sin SDS se corresponden con la presencia de flóculos estables en las condiciones de medida, los cuales fueron formados por el mecanismo de puenteo (Thanasukarn y col, 2004a). El grado de floculación porcentual para la emulsión control calculado a partir de las DTP en ausencia y presencia de SDS es  $17,90 \pm 0,20\%$ .

De forma equivalente a los estudios realizados a cortos tiempos de almacenamiento congelado los crioprotectores STST o sacarosa fueron agregados a la emulsión ASN inicial después del proceso de homogeneización. La presencia de los crioprotectores no modifica en gran medida la DTP de la emulsión cuando las medidas son realizadas en ausencia de SDS. Cuando se utiliza sacarosa  $D_{3,2}$  y  $D_{4,3}$  con o sin SDS arrojaron valores comparables sin importar la concentración ensayada ( $p < 0,05$ ; Tabla 47).

**Tabla 47:** Diámetros medios de Sauter ( $D_{3,2}$ ) y Diámetro medios De Brouckere ( $D_{4,3}$ ) obtenidos de las DTP. Las determinaciones fueron realizadas sin crioprotector o con el agregado de STST o Sac. Abreviaturas de las Figuras 43, 45 y 56.

Crioprotector ensayado	Concentración (% p/p)	- SDS	+ SDS	- SDS	+ SDS
		$D_{3,2}$	$D_{3,2}$	$D_{4,3}$	$D_{4,3}$
Ninguno	-----	$9,71 \pm 0,09^a$	$0,84 \pm 0,01^{a,b}$	$20,03 \pm 0,11^a$	$1,06 \pm 0,01^a$
Sac.	0,066	$9,71 \pm 0,12^a$	$0,84 \pm 0,01^{a,b}$	$19,20 \pm 0,48^b$	$1,05 \pm 0,02^a$
	0,33	$9,69 \pm 0,03^a$	$0,83 \pm 0,01^a$	$19,22 \pm 0,23^b$	$1,06 \pm 0,01^a$
	1,67	$9,74 \pm 0,04^a$	$0,83 \pm 0,01^a$	$19,31 \pm 0,28^b$	$1,08 \pm 0,01^a$
STST	0,2	$9,46 \pm 0,01^b$	$0,85 \pm 0,01^{a,b}$	$19,96 \pm 0,09^a$	$1,07 \pm 0,01^a$
	1,0	$9,62 \pm 0,04^a$	$0,86 \pm 0,01^{a,b}$	$20,04 \pm 0,13^a$	$1,23 \pm 0,10^b$
	5,0	$9,39 \pm 0,08^b$	$0,84 \pm 0,01^{a,b}$	$19,18 \pm 0,14^b$	$1,72 \pm 0,04^c$

Letras superíndice diferentes indican valores medios significativamente diferentes en una misma columna ( $p < 0,05$ ).

Sin embargo en presencia de SDS, las DTP exhiben pequeñas diferencias en función de la concentración de STST agregada. Mientras que los valores de  $D_{3,2}$  resultan comparables entre sí y con la emulsión control, para el caso de los  $D_{4,3}$  con SDS se encuentra una tendencia creciente en la medida que la concentración de STST se incrementa desde 0,2 hasta 5,0% p/p ( $p < 0,05$ ; Tabla 47). El valor de  $D_{4,3}$  de la emulsión conteniendo 0,2% de STST es significativamente menor respecto al de la emulsión con un 1,0% de STST y este último es a su vez significativamente menor que el  $D_{4,3}$  de la emulsión conteniendo 5,0% del suero industrial ( $p < 0,05$ ; Tabla 47). Este comportamiento no es observado cuando se utiliza a la



## *Efecto crioprotector de sueros*

sacarosa como crioprotector en una concentración equivalente. Estos aumentos en los  $D_{4,3}$  en presencia de SDS según el contenido de STST agregado fueron reportado en los ensayos a corto plazo (sección 7.2.2).

*Emulsiones ASN congeladas durante 1,5 a 130 días:* Seguiremos el esquema anteriormente usado analizando primero los cambios producidos durante un breve almacenamiento congelado, para luego abordar los cambios producidos durante un almacenamiento más prolongado.

En la Figura 57 se muestran los cambios producidos tras un almacenamiento congelado de 1,5 días. Puede verse que, respecto al control (sin congelar, curva negra) con un máximo  $\approx 10 \mu\text{m}$ , el proceso de CD en la emulsión sin crioprotector (curva en rojo), produce una importante desestabilización dando un amplio pico entre 100-900  $\mu\text{m}$  en ausencia de SDS (Figura 57a,c) el cual se resuelve en dos poblaciones con máximos en el rango 0,6-0,9 y 60-90  $\mu\text{m}$  con SDS (Figura 57b,d).

La formación de una capa de crema coagulada formada por flóculos, gotas coalescidas y proteínas agregadas es consistente con los hallazgos realizados previamente y por otros autores (Palazolo y Wagner, 2007 y 2010 y Palazolo y col., 2011).

Se observa una mejora en la estabilidad de la emulsión en la medida que se incrementa la concentración de STST o sacarosa utilizada; esto se traduce en una mayor proporción de partículas de tamaño similar al hallado en la emulsión sin congelar.

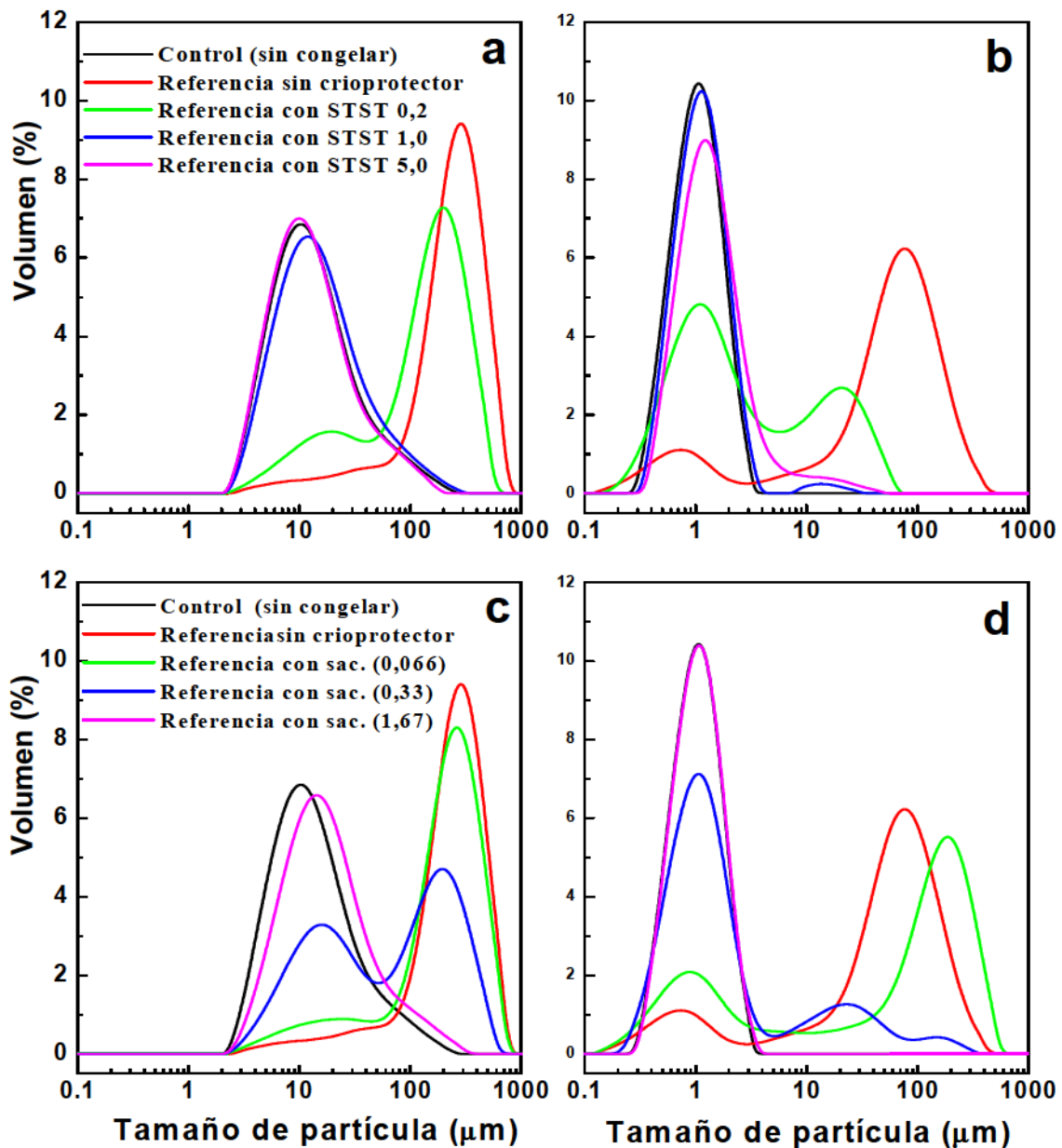
Sin embargo, STST presenta un nivel de crioprotección mayor respecto a la sacarosa. A concentraciones medias y altas (5,0 y 1,0% p/p equivalentes a 1,67 y 0,33% p/p de sacarosa respectivamente) la presencia de STST evita la formación de partículas de gran tamaño ( $>100 \mu\text{m}$ ) tanto en ausencia como en presencia del SDS al 1,0% p/v (Figuras 57a,b). Para el caso de la sacarosa solo resulta efectiva a la mayor concentración ensayada (1,67% p/p).

Luego de 1,5 días en estado congelado el AS% para todas las emulsiones es insignificante cuando se utiliza STST o sacarosa como crioprotectores, mientras que en ausencia de crioprotectores la cantidad de AS es  $8,0 \pm 0,2\%$ .

El agregado de crioprotectores es realizado para reducir al mínimo el deterioro debido al almacenamiento el cual se extendió hasta 19 semanas. Los incrementos en los valores de  $D_{4,3}$

## Efecto crioprotector de sueros

entre los ensayos realizados a tiempos cortos de almacenamiento y estos ensayos con el aumento en la cantidad de STST resultan comparables.



**Figura 57:** Distribución de tamaño de partículas de emulsiones ASN sin congelar (Control) o congeladas (Referencia) durante 1,5 días. Las concentraciones de los crioprotectores están expresadas en la emulsión final. Colores iguales indican concentraciones equivalentes de crioprotector. a y c: Sin SDS. b y d: Con SDS al 1,0% p/v.

Como se mencionó la sacarosa fue la más fácil de solubilizar, mientras que el STST demoró más tiempo y la dificultad aumentó con la concentración. La turbidez observada en las dispersiones de STST es atribuida a la presencia de fosfato de calcio insoluble y a la proteína

## *Efecto crioprotector de sueros*

que, como sabemos reduce su solubilidad debido al proceso de secado. Además de las partículas insolubles hemos postulado la presencia de agregados y la formación de flóculos en la emulsión. Cabe destacar que si bien estas partículas insolubles presentes en las emulsiones sin congelar (ubicadas en el rango de 4,0 a 100  $\mu\text{m}$ ; Figura 56) representan una proporción muy baja del volumen total de las partículas su presencia es suficiente para inducir los incrementos en los valores de los  $D_{4,3}$ . Esto se debe a que éste es un parámetro especialmente sensible a la presencia de partículas de gran tamaño.

Cuando se analizan las DTP en ausencia de SDS ambas poblaciones (partículas insolubles y flóculos de gotas) se superponen, lo que explica los valores similares de  $D_{4,3}$  obtenidos en la emulsiones ASN en ausencia y presencia del STST en estas condiciones de medida; no hallándose diferencias significativas entre la emulsión control y con el agregado de concentraciones medias o bajas de STST ( $p < 0,05$ ; Tabla 47).

En la Tabla 48 se presentan los grados de floculación en función del tiempo de almacenamiento congelado empleando diferentes crioprotectores. Respecto a la emulsión control se encuentra que el grado de floculación disminuye cuando se incrementa la concentración de STST en las emulsiones no congeladas (Tabla 48).

Como es bien sabido el GF es un parámetro que depende directamente de los valores de  $D_{4,3}$  con y sin SDS, de esta forma un incremento en los valores de  $D_{4,3}$  en presencia del surfactante se corresponde con una disminución en los valores del GF. Lo que se observa es que las emulsiones mezcladas con STST a baja concentración (0,2% p/p) o sacarosa equivalente exhiben valores similares para el GF respecto de la referencia (sin crioprotector; Tabla 48).

En condiciones de almacenamiento congelado y con el agua en forma de cristales de hielo la mayor parte de las emulsiones o/w estabilizadas con proteínas son inestables en ausencia de crioprotectores (Cornacchia y Roos, 2011; Ghosh y col., 2006; Magnusson y col., 2011; Palazolo y col., 2011 y Thanasukarn y col., 2004b).

Varios son los efectos desestabilizantes que pueden ocurrir para el caso de emulsiones o/w cuando se encuentran en estado congelado. Por un lado la cristalización del agua de la emulsión permite la formación de una fase no congelada que se caracteriza por estar concentrada en todos los solutos, lo que promueve un importante incremento en la fuerza iónica. En esta fase no congelada las altas concentraciones de solutos pueden apantallar las

## *Efecto crioprotector de sueros*

repulsiones electrostáticas entre las gotas aumentando la intensidad de las interacciones entre gotas.

Mientras que el volumen de la fase dispersa se incrementa en la medida que la cantidad de agua líquida se reduce durante el proceso de congelación, la fracción másica de aceite (o fracción volumétrica de aceite) puede aproximarse a un empaquetamiento compacto para el caso de emulsiones típicas. En estas condiciones la floculación, coalescencia y posteriormente el aceite liberado es promovido por el hecho que las gotas de aceite son forzadas a aproximarse entre si (Ghosh y Coupland, 2008; McClements, 2004 y Thanasukarn y col., 2004a).

**Tabla 48:** Grado de floculación de emulsiones ASN luego de diferentes tiempos de almacenamiento congelado. Se indican los crioprotectores ensayados y las concentraciones alcanzadas en la emulsión final. Las abreviaturas son las de las Tablas 43 y 45. n.d.: No determinado.

Emulsiones analizadas		No congeladas	Tiempo de almacenamiento congelado (días)		
			1,5	7	16
STST (% p/p)	0,2	17,45 ± 0,27 <sup>a</sup> <sub>1</sub>	11,95 ± 0,32 <sup>a</sup> <sub>2</sub>	n.d.	8,41 ± 0,06 <sup>a</sup> <sub>3</sub>
	1,0	15,42 ± 0,21 <sup>b</sup> <sub>1</sub>	16,86 ± 0,35 <sup>b</sup> <sub>2</sub>	22,34 ± 8,11 <sup>a</sup> <sub>1,2</sub>	30,56 ± 2,17 <sup>b</sup> <sub>2,3</sub>
	5,0	10,04 ± 0,33 <sup>c</sup> <sub>1</sub>	7,61 ± 0,38 <sup>c</sup> <sub>2</sub>	n.d.	8,88 ± 0,65 <sup>a</sup> <sub>3</sub>
Sac. (% p/p)	0,066	17,23 ± 0,90 <sup>a</sup> <sub>1</sub>	n.d.	3,00 ± 0,23 <sup>b</sup> <sub>2</sub>	3,08 ± 0,18 <sup>c</sup> <sub>2</sub>
	0,33	17,67 ± 0,23 <sup>a</sup> <sub>1</sub>	10,01 ± 0,22 <sup>d</sup> <sub>2</sub>	n.d.	11,32 ± 0,68 <sup>d</sup> <sub>3</sub>
	1,67	16,92 ± 0,04 <sup>a</sup> <sub>1</sub>	25,86 ± 3,90 <sup>e</sup> <sub>2</sub>	29,52 ± 2,20 <sup>a</sup> <sub>2,3</sub>	26,13 ± 3,31 <sup>e</sup> <sub>2</sub>
Emulsiones analizadas		Tiempo de almacenamiento congelado (días)			
		30	42	60	130
STST (% p/p)	0,2	8,00 ± 0,15 <sup>a</sup> <sub>4</sub>	5,00 ± 0,01 <sup>a</sup> <sub>5</sub>	4,76 ± 0,09 <sup>a</sup> <sub>6</sub>	n.d.
	1,0	38,78 ± 4,25 <sup>b</sup> <sub>3,4</sub>	42,73 ± 6,30 <sup>b</sup> <sub>4</sub>	61,86 ± 4,00 <sup>b</sup> <sub>5</sub>	n.d.
	5,0	n.d.	8,09 ± 0,64 <sup>c</sup> <sub>2,3</sub>	5,87 ± 0,07 <sup>c</sup> <sub>4</sub>	5,54 ± 0,33 <sup>a</sup> <sub>4</sub>
Sac. (% p/p)	0,066	2,96 ± 0,15 <sup>c</sup> <sub>2</sub>	n.d.	3,13 ± 0,21 <sup>d</sup> <sub>2</sub>	n.d.
	0,33	12,51 ± 0,71 <sup>d</sup> <sub>3</sub>	4,56 ± 0,16 <sup>d</sup> <sub>4</sub>	n.d.	n.d.
	1,67	33,85 ± 4,12 <sup>b</sup> <sub>3</sub>	41,56 ± 1,65 <sup>b</sup> <sub>4</sub>	49,40 ± 0,58 <sup>e</sup> <sub>5</sub>	n.d.

Letras superíndice diferentes indican valores medios significativamente diferentes para un mismo tiempo de almacenamiento congelado. Números subíndice diferentes indican valores medios significativamente diferentes para una misma concentración de crioprotector ( $p < 0,05$ ).

Hay dos factores que pueden jugar un rol decisivo en la estabilidad de las emulsiones preparadas con ASN. Por un lado la recristalización de hielo debido a las oscilaciones térmicas



## *Efecto crioprotector de sueros*

durante el almacenamiento. De acuerdo a la Figura 55, las fluctuaciones térmicas se reducen con el crioprotector. Adicionalmente hay que considerar no solo los cristales de hielo sino el efecto negativo de la cristalización de aceite.

De acuerdo a Ghosh y col. (2008) debido a la presión del hielo, las gotas de aceite pueden deformarse en cierto grado, además las gotas de aceite congelado concentran y transmiten la presión al punto de contacto entre las gotas. Esto favorece la ruptura del film interfacial debido al mecanismo de coalescencia parcial seguido de coalescencia total y aceite separado que se observa luego del proceso CD. El aceite de girasol usado en la fase dispersa de las emulsiones posee un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados ( $\approx 60\%$  de ácido linoléico).

De acuerdo a los cálculos teóricos realizados por Magnusson y col. (2011), a  $-20^{\circ}\text{C}$  el contenido de fase sólida para el caso del aceite de girasol es importante ( $\approx 30\%$ ). Sin embargo este cálculo asume condiciones isotérmicas y de equilibrio, lo cual está muy alejado de un congelamiento realizado en condiciones de aire inmóvil a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Palazolo y col. (2011) hallaron que la cantidad de aceite de girasol cristalizado resultó insignificante en las emulsiones o/w estabilizadas con aislado de soja nativo y desnaturalizado congeladas durante 24 h y analizadas por DSC. Los trabajos de Magnusson y col. (2011) incluyeron una emulsión o/w del tipo mayonesa la cual resultó estable tras un proceso de congelación y descongelación de 24 h cuando se utilizó aceite de girasol como fase dispersa. Sin embargo luego de 15 días de almacenamiento la emulsión resultó totalmente desestabilizada. Estos resultados concuerdan con la baja tasa de cristalización de los triglicéridos de aceite de girasol.

La mayor estabilidad hallada en nuestro sistema puede atribuirse al tamaño de las gotas que para el caso de las emulsiones preparadas con ASN ( $\approx 1\ \mu\text{m}$ ) es significativamente menor que el hallado en la mayonesa ( $\approx 5\ \mu\text{m}$ ), por lo que se espera una menor tasa de cristalización.

Los estudios de Berger (1997), demostraron que el grado de cristalización de un aceite se incrementa con el tamaño de las gotas ya que las gotas contienen impurezas las cuales actúan como núcleos de cristalización. Teniendo esto presente las condiciones de equilibrio se aproximarán cada vez más en la medida que el tiempo de almacenamiento de la emulsión aumente. De esta forma el alto contenido de fase grasa sólida que se espera se forme de acuerdo a los cálculos teóricos reportados por Magnusson y col. (2011) serán alcanzados entonces por el aceite de girasol.

## *Efecto crioprotector de sueros*

Los porcentajes de coalescencia de las emulsiones luego de diferentes períodos de almacenamiento congelado se muestran en la Tabla 49.

**Tabla 49:** Porcentajes de coalescencia de emulsiones ASN luego de diferentes períodos de almacenamiento congelado. Los crioprotectores ensayados STST y Sac. fueron agregados en niveles equivalentes tras la preparación de la emulsión. Las abreviaturas son las de las Tablas 43 y 45. Luego de 130 días solo fue posible calcular el porcentaje de coalescencia para la emulsión conteniendo STST al 5,0% ( $1,80 \pm 0,46$ ). n.d.: No determinado.

Emulsiones analizadas		Tiempo de almacenamiento congelado (días)		
		1,5	7	16
STST (% p/p)	0,2	$10,26 \pm 2,02^{a_1}$	n.d.	$18,80 \pm 2,05^{a_2}$
	1,0	$\approx 0^{b_1}$	$\approx 0^{a_1}$	$\approx 0^{b_1}$
	5,0	$0,25 \pm 0,10^{c_1}$	n.d.	$0,25 \pm 0,04^{c_1}$
Sac. (% p/p)	0,066	n.d.	$41,52 \pm 6,5^{b_1}$	$41,37 \pm 4,37^{d_1}$
	0,33	$8,23 \pm 0,01^{a_1}$	n.d.	$7,54 \pm 1,17^{e_1}$
	1,67	$\approx 0^{b_1}$	$\approx 0^{a_1}$	$\approx 0^{b_1}$
Emulsiones analizadas		Tiempo de almacenamiento congelado (días)		
		30	42	60
STST (% p/p)	0,2	$21,12 \pm 0,01^{a_3}$	$27,38 \pm 0,09^{a_4}$	$26,74 \pm 2,60^{a_4}$
	1,0	$0,15 \pm 0,06^{b_2}$	$0,17 \pm 0,03^{b_2}$	$0,22 \pm 0,09^{b_2}$
	5,0	n.d.	$0,45 \pm 0,05^{c_2}$	$0,76 \pm 0,15^{c_3}$
Sac. (% p/p)	0,066	$64,41 \pm 1,96^{c_2}$	n.d.	$72,67 \pm 5,60^{d_3}$
	0,33	$7,78 \pm 0,73^{d_1}$	$26,01 \pm 7,60^{a_2}$	n.d.
	1,67	$< 0,01^{e_1}$	$0,02 \pm 0,01^{d_1}$	$0,06 \pm 0,02^{e_2}$

Letras superíndice diferentes indican valores medios significativamente diferentes para un mismo tiempo de almacenamiento. Números subíndice diferentes indican valores medios significativamente diferentes para una misma concentración de crioprotector ( $p < 0,05$ ).

Durante todo el almacenamiento se observa que, a niveles bajos y medios el STST es más efectivo en su capacidad de proteger a la emulsión contra la coalescencia que la sacarosa, mientras que a altos niveles la capacidad crioprotectora resulta comparable. Los niveles de coalescencia registrados con el STST a 0,2 y 1,0% en la emulsión final son significativamente menores a los hallados con niveles de sacarosa equivalente para todos los tiempos de almacenamiento considerados. Por el contrario los niveles de coalescencia alcanzados con el STST al 5,0% resultan comparables a los de sacarosa equivalente hasta los 30 días de almacenamiento congelado ( $p < 0,05$ ; Tabla 49).

## *Efecto crioprotector de sueros*

Con respecto al grado de floculación, y tomando como referencia la emulsión congelada durante 1,5 días se observa con 0,2% de STST una significativa disminución en los valores floculación en función del tiempo de almacenamiento ( $p < 0,05$ ; Tabla 48). Mientras que a concentraciones medias y altas la coalescencia no es inhibida por el STST observándose un incremento en el GC ( $p < 0,05$ ; Tabla 49).

Este comportamiento puede explicarse si se considera los procesos simultáneos de floculación y coalescencia que suceden durante el almacenamiento congelado. (Tablas 48-49). De esta forma la gran cantidad de flóculos presentes en la emulsión inicial, así como los formados durante el proceso de congelamiento simplemente no resisten el estrés ejercido por la presión del hielo y consecuentemente se desestabilizan por coalescencia (Palazolo y col., 2011).

El STST a concentraciones intermedias previene eficazmente la coalescencia dando valores que son -para todos los tiempos analizados- inferiores a los obtenidos con cantidades equivalentes de sacarosa. Por el contrario el proceso de floculación no es controlado en forma efectiva empleando STST hallándose para la misma concentración que los valores se incrementan con el tiempo de almacenamiento (Tabla 48).

El comportamiento observado puede explicarse suponiendo que en la medida que el tiempo de almacenamiento se prolonga se incrementa la formación de nuevos flóculos estables a la coalescencia durante el almacenamiento congelado. De acuerdo a los grados de floculación y coalescencia obtenidos (Tablas 48-49) la adición del STST inhibe la formación de nuevos flóculos sin variaciones importantes en el grado de coalescencia.

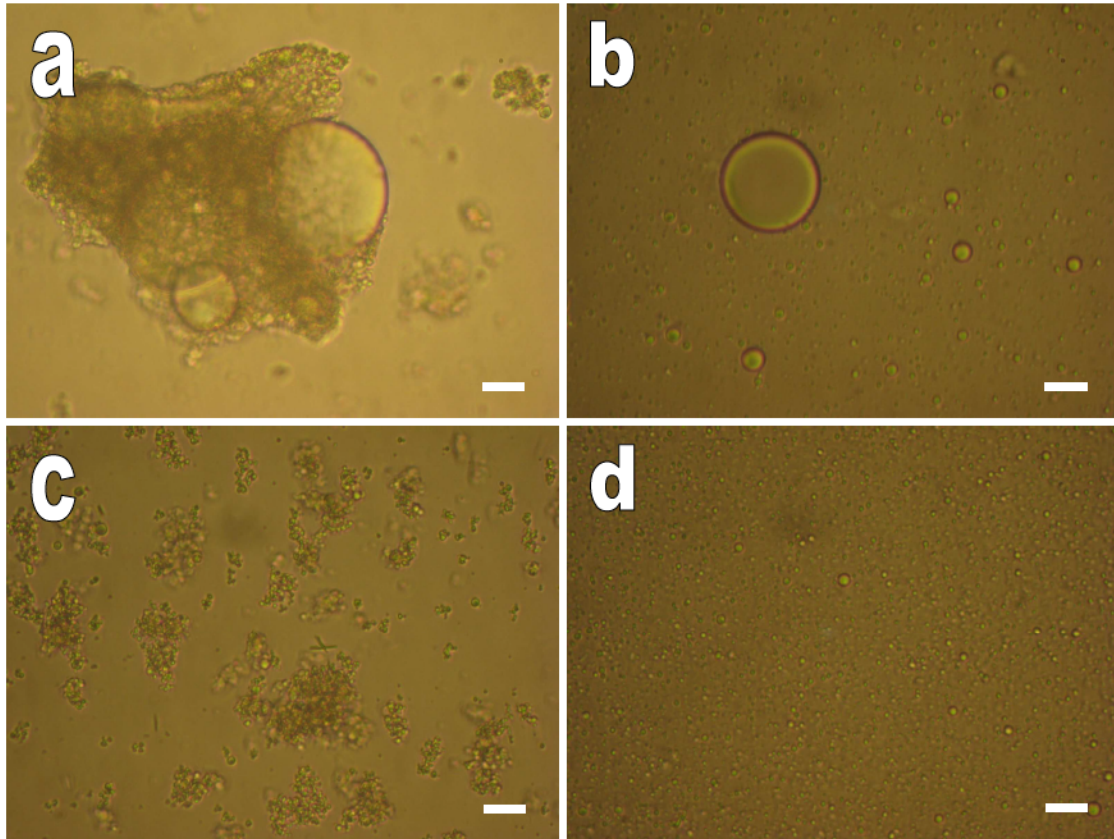
En contraste cuando la sacarosa es usada como crioprotector la coalescencia solo es inhibida a la concentración más alta exhibiendo un comportamiento similar al observado usando STST a concentraciones intermedias. A concentraciones intermedias de sacarosa (0,33% p/p) las emulsiones exhiben un notable incremento en el GC% especialmente luego de 42 días de almacenamiento congelado lo que es consistente con la disminución en el GF% observado (Tablas 48-49).

Es interesante remarcar que luego de 130 días de almacenamiento congelado todas las emulsiones excepto aquellas formuladas con el STST al 5,0% p/p presentan un alto grado de desestabilización (detectable como aceite libre tras la descongelación) similar a la emulsión control. Debido al alto grado de desestabilización de las emulsiones no es posible el cálculo de los grados de floculación y coalescencia.



## *Efecto crioprotector de sueros*

Estudios complementarios tales como la micrografía óptica de las emulsiones luego de 16 días de almacenamiento congelado revela importantes diferencias micro estructurales (Figura 58).



**Figura 58:** Micrografías ópticas (400×) de emulsiones ASN congeladas durante 16 días empleando STST como crioprotector. En a)-b) se utiliza 0,2% p/p de STST en la emulsión final. a: Sin SDS. b: Con SDS. En c)-d) se utiliza 5,0% p/p de STST en la emulsión final; c: Sin SDS. d: Con SDS. La barra de escala en la parte inferior de las micrografías corresponde a 10 µm.

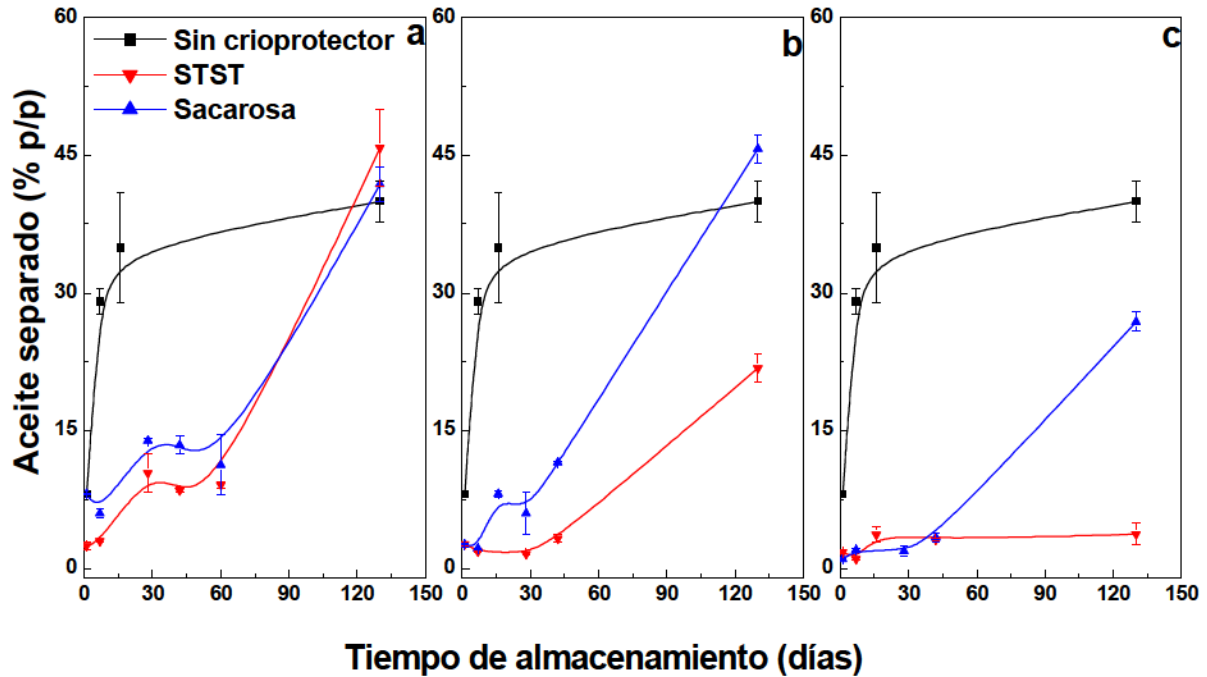
A bajos niveles de STST (0,2% p/p) y en ausencia de SDS, se observa la presencia de flóculos, agregados proteicos y gotas coalescidas, mientras que en presencia del detergente los flóculos y los agregados proteicos no son observados y la micrografía exhibe solo la presencia de gotas pequeñas y algunas coalescidas (Figura 58a,b). Por otra parte empleando la máxima concentración de STST se obtiene una emulsión flocculada en donde los flóculos están totalmente disociados cuando la determinación es realizada con SDS exhibiendo una microestructura similar a la de la emulsión no congelada inicial (Figura 58c,d).

La cantidad de AS% es analizada en función del tiempo de almacenamiento (Figura 59). En la emulsión referencia (sin crioprotectores) el AS% se incrementa rápidamente a los 30 días,



## Efecto crioprotector de sueros

alcanzando su máximo valor ( $\approx 40\%$ ) luego de ser almacenadas por un largo período. Un estudio comparativo entre la sacarosa y el STST a bajo nivel de crioprotector revela un comportamiento similar con valores de AS% similares a la referencia luego de 130 días de almacenamiento congelado (Figura 59a).



**Figura 59:** Influencia de la concentración del crioprotector (STST o sacarosa) y del tiempo del almacenamiento congelado en la cantidad de aceite libre para emulsiones ASN. Concentración de carbohidratos totales (% p/p): a) 0,066; b) 0,33 y c) 1,67.

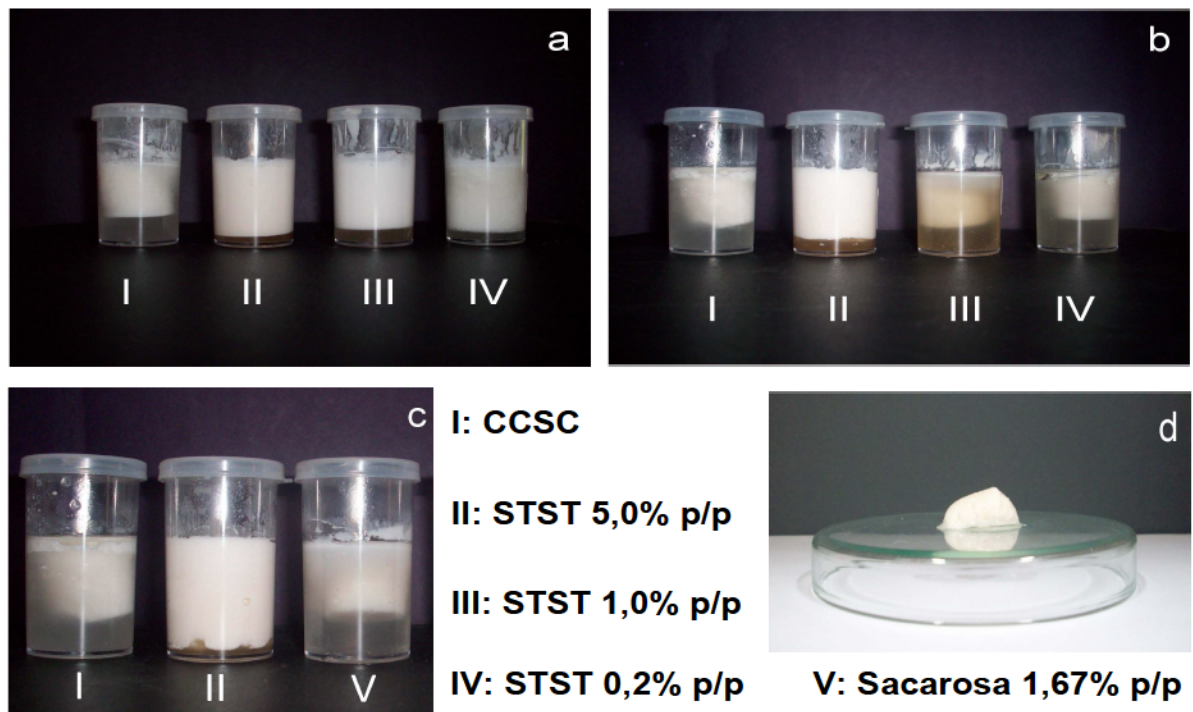
Por otra parte para concentraciones medias y altas de crioprotector las diferencias entre sacarosa y STST resultan evidentes, especialmente luego de 40 días de almacenamiento congelado (Figuras 59b,c). Usando un 5,0% p/p de STST la integridad de las gotas se mantiene y luego de 130 días de almacenamiento congelado el AS es menor al 4% (Figura 59c). Solo para esta emulsión es posible calcular GF y GC (Tablas 48-49).

A fin de complementar los resultados mencionados, se analiza las apariencias de las emulsiones a partir de fotografías macroscópicas de los frascos conteniendo las emulsiones. Las Figuras 60a,b muestran las imágenes de las emulsiones descongeladas luego de 1,5 y 130 días de almacenamiento respectivamente en ausencia y presencia de STST. Con fines comparativos se incluyó como referencia a la emulsión congelada sin el agregado de crioprotectores.

## *Efecto crioprotector de sueros*

Aunque en todos los casos se observa separación gravitacional, a las menores concentraciones de STST (0,2 y 1,0% p/p) la apariencia de las emulsiones sometidas a diferentes tiempos de almacenamiento es notablemente diferente.

Mientras que a alta concentración de STST (5,0% p/p) la mayor parte de la fase dispersa permanece en estado emulsionado independientemente del tiempo de almacenamiento considerado. La presencia de una cantidad equivalente de sacarosa (1,67% p/p) no resulta efectiva luego de un 130 días de almacenamiento congelado (Figura 60c), lo que resulta consistente con un alto valor de AS% (Figura 59). Además del aceite libre, se observa en la emulsión descongelada la formación de un crio-gel autoportante formado por proteínas de soja agregadas y gotas de aceite ocluidas. Este crio-gel pudo ser fácilmente retirado del frasco contenedor (Figura 60d).



**Figura 60:** Fotografías de emulsiones ASN descongeladas dentro de sus frascos de almacenamiento conteniendo STST o sacarosa en las concentraciones finales indicadas. CCSC: Definido en Figura 54. a) 1,5 días a  $-18^{\circ}\text{C}$ . b, c) 130 días. d) crio-gel autoportante separado de la emulsión con agregado de sacarosa.

Las moléculas de aceite permanecen en la matriz del crio-gel, por lo que su densidad es diferente a la del medio acuoso que la rodea. Este hecho explica el máximo valor de aceite libre ( $\approx 40\%$  p/p) alcanzado luego de 130 días de almacenamiento, por lo que este aceite no

## *Efecto crioprotector de sueros*

fue determinado por la técnica de dilución del colorante. Las diferencias observadas en el poder crioprotector del STST y la sacarosa para tiempos de almacenamientos prolongados pueden depender de varios factores. Por un lado la sacarosa es el carbohidrato soluble mayoritario presente en el STST (> 50%; Espinosa-Martos y Rupérez, 2006). Sin embargo la presencia de otros oligosacáridos y monosacáridos (tales como la estaquiosa y la glucosa) así como péptidos solubles pueden modificar la capacidad de la sacarosa para cristalizar y por lo tanto extender la capacidad crioprotectora durante el almacenamiento congelado durante largos períodos de tiempo.

Por otra parte la presencia de proteínas en fase acuosa, puede tener un efecto estabilizador adicional sobre la emulsión ASN. Ghosh y col. (2006) informaron una mayor estabilidad para emulsiones modelo preparada con caseinato de sodio y n-dodecano luego de un almacenamiento congelado cuando en las mismas se halló proteínas no adsorbidas. Es razonable suponer que la proteína no adsorbida ubicada entre dos interfases proteicas pueda producir una estabilización estérica contra la coalescencia. Este razonamiento es similar al dado por Carpenter y Crowe (1988) para el incremento en la estabilidad hallado luego de los procesos de CD para enzimas en la medida que se incrementó la concentración o cuando se le agregó otra proteína como la seroalbúmina bobina. De acuerdo a estos autores las proteínas que no se asocian o agregan y permanecen como moléculas de proteínas individuales siendo incapaces de penetrar la capa de hidratación de las moléculas de proteínas vecinas.

Palazolo y col. (2011) hallaron recientemente que la globulina 11S no adsorbida no ejerció un efecto crioprotector durante el almacenamiento congelado debido a su capacidad de agregarse e insolubilizarse a temperaturas subcero. Por el contrario las proteínas de suero desnaturalizadas exhiben un comportamiento diferente respecto de la globulina 11S pudiendo contribuir a la estabilidad de la emulsión.

Adicionalmente el proceso de preparación del STST que implica numerosos tratamientos térmicos aplicados durante varios días indujo la glicosilación de las proteínas de suero debido a las etapas de concentración y a la presencia de azúcares solubles (Sobral y Wagner, 2009). La presencia de proteínas glicosiladas en la fase acuosa puede retardar el proceso de recristalización así como el crecimiento de cristales de hielo de forma alargada durante el almacenamiento congelado. La capacidad anticongelante de algunas proteínas halladas en el



suero de peces marinos de aguas muy frías ha sido ampliamente estudiada (Fenney y Yeh, 1998).

En este marco es interesante explorar el posible efecto crioprotector de las proteínas de suero glicosiladas. Sin embargo debido a la complejidad del STST se requerirán experimentos adicionales para precisar la importancia relativa de los factores mencionados en la capacidad crioprotectora de emulsiones preparadas con aislado nativo de soja u otras proteínas. Los experimentos realizados demuestran el alto poder crioprotector del STST en emulsiones modelo o/w durante el almacenamiento congelado durante períodos prolongados en condiciones de almacenamiento que favorecen en gran medida la recristalización de hielo.

### **7.4 Conclusiones parciales**

Se analizó el poder crioprotector de los sueros deshidratados de soja y tofu en cantidades másicas iguales sobre emulsiones modelos preparadas con aislado de soja nativo (ASN) o caseinato de sodio (CS) las cuales, en ausencia de crioprotector, mostraron diferencias en la estabilidad frente al proceso de congelación-descongelación (CD)

Debido a que se estima que la acción crioprotectora en los sueros deshidratados es debida a la fracción de hidratos de carbono, se realizaron ensayos comparativos utilizando concentraciones equivalentes de sacarosa como control.

Respecto a la emulsión obtenida con ASN se obtuvo una emulsión menos floculada con CS la cual resultó más estable al proceso de CD, desestabilizándose ambas emulsiones por coalescencia. Para la emulsión CS el desempeño de SSL fue superior que el obtenido con cantidades másicas iguales de STST o cantidades equivalentes de sacarosa. Se halló un aumento en el poder crioprotector con la concentración, obteniéndose el mejor resultado con SSL al 5,0% con valores de coalescencia luego de 28 días de almacenamiento comparables a los hallados al inicio del almacenamiento.

La emulsión ASN referencia (sin crioprotector) resultó altamente floculada y luego de un proceso de CD de apenas 1,5 días mostró una desestabilización de los flóculos por coalescencia. Para un mismo tiempo de almacenamiento congelado el poder crioprotector aumentó con la concentración de crioprotector agregado a la emulsión. Ambos sueros



## *Efecto crioprotector de sueros*

mostraron un poder crioprotector mayor que sus respectivos controles equivalentes de sacarosa, pero comparando entre sueros se halló que el STST se desempeñó mejor que SSL.

Los estudios a largo plazo fueron realizados con la emulsión obtenida con ASN debido a su menor estabilidad utilizando al STST como crioprotector y sacarosa equivalente como control.

La utilización del STST se debió a su mejor desempeño como crioprotector a tiempos cortos de almacenamiento. Adicionalmente debido a su composición y a los tratamientos térmicos aplicados durante la obtención del STST permite un mayor aporte de calcio y proteínas glicosiladas, teniendo los factores antitripticos adecuadamente inactivados. En estos ensayos a largo plazo (130 días) la sacarosa, aun a la máxima concentración, no logró evitar la desestabilización de la emulsión, separando aceite y formando un crio-gel formado por proteínas agregadas y gotas de aceite ocluidas.

Utilizando concentraciones intermedias el STST logró una mayor prevención de la coalescencia respecto al obtenido con niveles equivalentes de sacarosa, no pudiendo controlar de manera efectiva el proceso de floculación observándose un aumento del GF% con el tiempo de almacenamiento para una misma concentración de STST.

Por el contrario a concentraciones altas se hallaron mayores diferencias entre la sacarosa y el STST, especialmente luego de 40 días de almacenamiento congelado. Utilizando un 5,0% p/p de STST la mayor parte de la fase dispersa permaneció emulsionada independientemente del tiempo de almacenamiento considerado. Esta fue la única emulsión en la que se mantuvo la integridad de las gotas luego de 130 días de almacenamiento congelado y en donde fue posible calcular GF% y GC%.

# CONCLUSIONES

## Conclusiones

El suero de soja (SS), proveniente de la obtención de aislados y el suero de tofu (ST) son subproductos altamente diluidos, siendo su contenido de sólidos menor al 3,5%. Para su mejor conservación y empleo en esta tesis fueron secados por liofilización o por calor a presión reducida, lo cual dio origen a las muestras SSL y STL (SS y ST liofilizados), SSST y STST (SS y ST secados térmicamente). Estos productos están compuestos mayormente por carbohidratos y proteínas, denominadas proteínas de suero (PS). Las proteínas aisladas a partir del SS (PSS) por *salting out* (con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) y posterior diálisis tienen un contenido de proteínas mayor al 90%, en tanto que las obtenidas por precipitación con acetona en frío tienen menor pureza (proteínas menor al 60%) y por ende, un contenido mayor de carbohidratos y sales. PSS están formadas por subunidades de lectina (L) y por los inhibidores de la tripsina de Kunitz (ITK) y de Bowman-Birk (ITBB), estando estos inhibidores en estado activo. Las PS de tofu aisladas con acetona (PST) son más complejas conteniendo tanto las proteínas propias del suero de soja como algunas subunidades de proteínas de reserva de soja. Debido a que la obtención del ST incluye un tratamiento térmico en presencia de sales de calcio, PST presentan cierto grado de glicosilación, un elevado contenido de calcio unido y sólo una actividad inhibitoria de tripsina residual (menor al 10%) atribuible al ITBB.

Los estudios realizados por calorimetría diferencial de barrido mostraron que el comportamiento térmico de las PSS depende del pH del SS y del método de precipitación. Las PSS aisladas con acetona presentan un menor grado de desnaturalización (GD) pero un mayor grado de agregación (son más insolubles) que las aisladas por *salting out*. Para una misma forma de aislamiento se obtienen proteínas más desnaturalizadas desde SS a pH 4,5 que a pH 8,0. Las PST tienen un GD prácticamente del 100%. El almacenamiento de la harina o las proteínas aisladas modifica el comportamiento térmico de las PSS; para estas últimas, el comportamiento térmico también puede verse modificado por almacenamiento de los productos intermedios (precipitados isoelectrónicos). El almacenamiento en cualquiera de las etapas induce en distinto grado, desnaturalización y/o agregación de las proteínas aumentando su estabilidad térmica.

El comportamiento térmico de ITK y L, tanto en PSS como en SSL, es dependiente del contenido de humedad, siendo ITK el más afectado. Se halló un punto de inversión de la estabilidad térmica de ITK y L para un mismo contenido de humedad ( $\approx 2$  g agua/g proteína). Por encima de dicho punto la estabilidad térmica de ITK es menor que la de la L mientras que por encima sucede lo contrario.

## Conclusiones

Las proteínas en SS y ST están solubles pero por efecto de la congelación (paso previo de la liofilización) o el secado térmico se induce una agregación proteica que reduce su solubilidad en agua o en buffer a pH 7,0 (S). La S de las PS depende del suero de partida, del ajuste de su pH y de la forma de aislamiento, siendo las más solubles las obtenidas por *salting out* desde SS a pH 8,0 y las menos solubles las PST.

La agregación proteica inducida durante el almacenamiento (de la harina, del precipitado isoeléctrico -refrigerado o congelado- o de las proteínas aisladas) reduce la S. La desnaturalización total de las PSS por calentamiento (100°C) en dispersiones acuosas, reduce la S, sin cambios apreciables en el caso de las PST. Las determinaciones de fluorescencia e hidrofobicidad superficial permitieron detectar cambios conformacionales tanto en las fracciones solubles como insolubles de los aislados atribuibles al tipo de muestra y a la desnaturalización. Los agregados mostraron en la mayoría de los casos tener una hidrofobicidad superior respecto a las proteínas solubles.

El estudio del comportamiento superficial se realizó por tensiometría de gota (interfase agua/aire) empleando dispersiones acuosas de las proteínas aisladas con y sin calentamiento y de sus fracciones solubles. Todas presentaron propiedades superficiales comparables con las de un aislado de soja nativo (ASN). Se observó una mejora de esta propiedad con el tratamiento térmico y que, en el caso particular de las PSS hay una contribución de los agregados insolubles al comportamiento superficial. Entre las PSS, la que mostró el mejor desempeño debido a la presencia de agregados con actividad superficial fue la precipitada por *salting out* a pH 8,0 calentada. La muestra PST exhibió una aceptable actividad superficial pese a su baja solubilidad y a la presencia de calcio.

La capacidad de formar y estabilizar emulsiones o/w fue analizada en forma comparativa entre los sueros deshidratados y las proteínas aisladas, utilizando ASN como control. En todos los casos, a concentración proteica equivalente, las proteínas aisladas resultan mejores emulsificantes que los sueros.

Entre los sueros deshidratados, el que presentó la mayor capacidad emulsionante fue STST. La estabilidad de las emulsiones preparadas con este suero se explica por la presencia de proteínas desnaturalizadas-glicosiladas y de calcio. Por otra parte, el tratamiento térmico en condiciones anhidras del SSL hasta 150°C temperatura a la que se logra la total desnaturalización de sus proteínas (incluida la inactivación de ITK), promueve la



## *Conclusiones*

glicosilación y mejora su propiedad emulsionante. Cuando estas proteínas son aisladas con acetona dan emulsiones estables pese a la reducción en la S.

Las PSS al igual que ASN mejoran sus propiedades emulsionantes al ser sometidas a una desnaturalización total en dispersiones acuosas. Las emulsiones de menor tamaño de partícula y de mayor estabilidad son las PSS aisladas a pH 4,5 y las menos estables las obtenidas con PST.

Se demostró que STL y STST tienen acción crioprotectora sobre emulsiones modelo o/w preparadas con ASN o con caseinato de sodio, reduciendo su desestabilización durante el proceso de congelación-descongelación (CD). Esta acción crioprotectora se evidenció en mayor medida en las emulsiones ASN por ser inicialmente más floculadas y menos estables a la coalescencia (C) luego de un proceso CD. Esta propiedad se justifica debido al alto contenido de carbohidratos en los sueros.

Las emulsiones ASN conteniendo cantidades equivalentes de sacarosa (crioprotector control) fueron menos estables al proceso de CD que las protegidas con SSL o STST. Entre los sueros, el STST resultó ser el mejor pese a que si bien sus proteínas son menos solubles, hay presencia de proteínas glicosiladas que aumentarían las interacciones con la interfase y la repulsión entre gotas. Los estudios a largo plazo de almacenamiento congelado ( $-18\pm 4^{\circ}\text{C}$  hasta 130 días) realizado con emulsiones con adición de sacarosa equivalente como crioprotector demostraron que no es capaz, aún a su máxima concentración, de evitar la coalescencia y la formación de un crio-gel. Mientras que en estudios similares con STST la fase dispersa permaneció emulsionada, se separó muy poco aceite, manteniéndose la integridad de las gotas.

Se puede concluir finalmente, que los sueros de soja y de tofu tienen potenciales aplicaciones tecnológicas en la industria alimentaria, dado que pueden ser empleados una vez deshidratados por sus propiedades crioprotectoras o ser fuente de proteínas aisladas con buenas propiedades funcionales.

# REFERENCIAS

## *Referencias*

- Abelson, J.N. y Melvin, S.I. (1990). En: *Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology*, Sección VIII, Purification Procedures: Electrophoretic Methods, Edited by Murray P Deutscher, Academic Press. 433.
- Akhtar M y Dickinson E. (2007). Whey protein–maltodextrin conjugates as emulsifying agents: an alternative to gum Arabic. *Food Hydrocolloids* 21:607–616.
- Anderson, R.L (1992) Effects of steaming on soybean proteins and trypsin inhibitors. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 1170-1176.
- Anton, M., Beaumal, V., Brossard, C., Llamas, G., y LeDenmat, M. (2002). Droplet flocculation and physical stability of oil-in-water emulsions prepared with hen egg yolk. En: M. Anton, M (Ed.), *Food Emulsions and Dispersions*. Kerala, India: Research Signpost. pp, 15-28.
- Aponte-Ramírez, L., Ramírez Zayas, R.; Hernández González, S. y Somontes Zamora, D. (2009). Los procesos de glucosilación no enzimática. *AMC [online]*, vol.13, n.6, pp. 0-0. ISSN 1025-0255.
- Ben Ounis, W., C.P. Champagne, J. Makhlouf y L. Bazinet. (2008). Utilization of tofu Whey pre-treated by electromembrane process as a growth medium for *Lactobacillus plantarum* LB17, *Desalination*, 229, 192-203.
- Berger, K.G. (1997). Ice creams, en *Food Emulsions: Third edition, revised and expanded*. Friberg, S.E y Larsson, K. (Eds.). New York: Marcel Dekker, Inc., 413-491
- Birk, Y. (1987) Proteinase inhibitors. In *Hydrolytic Enzymes Elsevier Science Publishers*, pp. 257-300, A. Neuroberger & K. Brocklehurst, Amsterdam, Holland.
- Blanksby, S.J. y Ellison, G.B. (2003). Bond dissociation energies of organic molecules. *Acc. Chem. Res.* 36(4), 255–263.
- Britten, M. y Giroux, H.J. (1991). Coalescence index of protein-stabilized emulsions. *Journal of Food Science*, 56, 792-795.
- Campbell, M.F., Kraut, C.W., Yackel, W.C. y Yang, H.S. (1985). Soy protein concentrate. En *New Protein Foods. Seed Storage Proteins*, vol. 5, Altschul, A.A., and Wilcke, H.L. Academia Press. Orlando.
- Careri, G., Giansanti, A. y Gratten, E. (1979). Lysozyme film hydration event: An IR and gravimetric study. *Biopolymers*. 18, 1187-1203.
- Carpenter, J.F. y Crowe, J.H. (1988). The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology*, 25, 244-255.
- Carvajal, P.A., MacDonald, G.A. y Lanier, T.C. (1999). Cryostabilization mechanism of fish muscle proteins by maltodextrins. *Cryobiology*, 38(1), 16-26.
- Casale, M.G. (2004). Aplicaciones de la soja en la tecnología alimentaria. En *Soja y Nutrición: Informe sobre el uso y la seguridad de la soja en la alimentación*. (Harris, S., Kovalskys, I., Musi, J.C.L. y Rubinstein, C., Editores), Buenos Aires. CDD 633.34: 613.2.

## Referencias

- Castellani, O., Belhomme, C., David-Briand, E., Guérin-Dubiard, C. y Anton, M. (2008). The role of metal ions in emulsion characteristics and flocculation behaviour of phospholipid-stabilised emulsions. *Food Hydrocolloids*, 22, 1243-1253.
- Chang, H.C. y Doerge, D.R. (2000). Dietary Genistein Inactivates Rat Thyroid Peroxidase in Vivo without an Apparent Hypothyroid Effect. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Vol. 168, Issue 3, pp 244–252.
- Cheftel, J.C., Cuq, J.L y Lorient, D. (1989). Las proteínas de soja En: *Proteínas Alimentarias*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 6, 257-275.
- Cheftel, C.J., Cuq, J.L. y Lorient, D. (1993) Aminoácidos, péptidos y proteínas. En *Química de los alimentos*. Director O. R. Fennema, Editorial Acribia, Zaragoza, España, Capítulo 5, 275-414.
- Chevalier, F., Chobert, J. M., Popineau, Y., Nicolas, M. G., y Haertlé, T. (2001). Improvement of functional properties of  $\beta$ -lactoglobulin glycosylated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar. *International Dairy Journal*, 11(3), 145-152.
- Cornacchia, L. y Roos, Y.H. (2011). Lipid and water crystallization in protein-stabilised emulsions. *Food Hydrocolloids*, 25, 1726-1736.
- Cuniberti, M., Herrero, R. y Baigorri, H. (2004). El cultivo de la soja en Argentina. En *Soja y Nutrición: Informe sobre el uso y la seguridad de la soja en la alimentación*. (Harris, S., Kovalskys, I., Musi, J.C.L. y Rubinstein, C., Editores), Buenos Aires. CDD 633.34: 613.2.
- Damodaran, S. y Song, K.B. (1988). Kinetics of adsorption of protein at interfaces: role of protein conformation in diffusional adsorption. *Biochimica et Biophysica Acta*, 954, 253-264.
- Damodaran, S. (1989) Interrelationship of Molecular and Functional Properties of Food Proteins. En *Food Proteins*. Kinsella, J. E. y Soucie, W. G. (Editores). Am. Oil Chem. Soc, Champaign, IL, EEUU. Chap. 3, pp 21-51.
- de Luna Jiménez, A. (2006). Valor Nutritivo de la Proteína de Soya. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, N° 36.
- Díaz Cruz, A. (2006). *Revista Pediatría: de la publicación científica impresa a la electrónica*. Vol 3, N° 3, ISSN 0718-0918.
- Divi, R.L., Chang, H.C. y Doerge, D.R. (1997) Anti-Thyroid Isoflavones from Soybean: Isolation, Characterization, and Mechanisms of Action. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 54, Issue 10, pp 1087-1096.
- Dougnac, G. M (2010). “Apuntes acerca de la historia de la soja en la Argentina. Elementos para delinear experiencias comparadas” IV Congreso Argentino de Administración pública, sociedad, estado y administración. vol 3 N° 2. Versión electrónica: <http://www.econ.uba.ar/www/servicios/Biblioteca/bibliotecadigital/Indice%20alfabetico/indicea.htm>
- Dubois M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars; *Agric. Research Service*, Vol. 28, N° 3.



## *Referencias*

- Einhorn-Stoll U, Ulbrich M, Sever S y Kunzek H. (2005). Formation of milk protein–pectin conjugates with improved emulsifying properties by controlled dry heating. *Food Hydrocolloids* 19:329–340.
- Eftink, M.R. (2000). Intrinsic fluorescence of proteins. In J.R. Lakowicz (Ed.) *Topics in fluorescence spectroscopy*. Volume 6: Protein fluorescence (Ch 1, pp 1-16). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Endres J.G. (2001). *Soy Protein Products Characteristics, Nutritional Aspects, and Utilization*. AOCS Press. Champaign, IL. USA. Pp 1-53.
- Erdman, J.W. Jr. (1995). Control of blood lipids with soy protein, *N Eng J Med*. 333, 313-315.
- FAO/WHO. (1991) Protein quality evaluation: Report of joint FAO/WHO expert consultation, Food and Nutrition. Paper 51. FAO.
- Espinosa-Martos, I., Préstamo, G. y Rupérez, P. (2006) Composición y Propiedades del Suero de Soja, un subproducto de la elaboración del tofu. *Alimentaria*, marzo, 72-73
- Espinosa-Martos, I. y Rupérez, P. (2006). Soybean oligosaccharides. Potential as new ingredients in functional food. *Nutr. Hosp.* 21 (1), 92-96
- Fenney, R.E. y Yeh, Y. (1998). Antifreeze proteins: current status and possible food uses. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 102-106.
- Folch, J., Lees, M., y Sloane-Stanley, G. H. (1958). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. biol. Chem*, 226(1), 497-509.
- Freifelder, D. (1976) *Physical Biochemistry. Application to Biochemistry and Molecular Biology*, W. H. Freeman y col., San Francisco, 410-21.
- Fujita, Y. y Noda, Y. (1978). Effect of hydration on the thermal denaturation of lysozyme as measured by differential scanning calorimetry. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 51(5), 1567-1568.
- Fujiwara K, Oosawa T y Saeki H. (1998). Improved thermal stability and emulsifying properties of carmyofibrillar proteins by conjugation with dextran. *J Agric Food Chem* 46:1257–1261
- Ghost, S y Coupland, J.N. (2008) Factors affecting the freeze-thaw stability of emulsions. *Food Hydrocolloids*, 22, 105-111.
- Ghosh, S., Cramp, G.L. y Coupland, J.N. (2006). Effect of aqueous composition on the freeze-thaw stability of emulsions. *Coll. & Surf. A. Physicochem. Eng. Aspects*. 272, 82-86.
- Gonzalez, R. y Carrillo, D. (1987) *Nutrición humana. Manual de prácticas*. La Habana, Cuba. Ed. Pueblo y Educación, 34-36.
- Graham, D.E. y Phillips, M.C. (1979). Proteins at liquid interfaces. III. Molecular structures of adsorbed films. *Journal of Colloids Interface Science*, 70, 427-433.
- Hall, G.M. (1996) Basic concepts. En *Methods of testing protein functionality*. Hall, G. M. (Editor). Chapman y Hall, London, UK, Cap. 1, 1-10.

## *Referencias*

Handa A y Kuroda N. (1999). Functional improvements in dried egg white through the Maillard-reaction. *J Agric Food Chem* 47:1845–1850

Harms-Ringdahl, M., Forsberg, J., Fedorcsák, I. y Ehrenberg, L. (1979). Trypsin inhibitory activity of a polypeptide isolated from red kidney beans that also enhances lymphocyte stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86, 492-499

Hartel, R. (1996). Ice recrystallization during the manufacture of ice cream. *Trends in Food Science and Technology*, 7, 315-321.

Hartel, R.W. (2001). *Crystallization in foods*, Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, USA.

Haskard, C.A. y Li-Chan, E.C.Y. (1998). Hydrophobicity of Bovine Serum Albumin and Ovalbumin Determined Using Uncharged (PRODAN) and Anionic (ANS-) Fluorescent Probes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 7, 2671-2677.

Hermansson, A.M. (1978). Physico-chemical aspects of soy proteins structure formation. *J. Text. Stud.*, 9, 33-58.

Hermansson, A.M. (1986). Soy protein gelation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 3, 658-666.

Hernández-Ledesma, B., Hsieh, C., y de Lumen, B. O. (2009). Lunasin and Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) in US comercial soy foods. *Food Chem*, 115, 574-580.

Hua, Y., Cui, S.W., Wang, Q., Mine, Y. y Poysa, V. (2005). Heat induced gelling properties of soy protein isolates prepared from different defatted soybean flours. *Food Res. Int.* 38, 377-385.

Innocente, N., Biasutti, M. y Blecker, C. (2011). HPLC profile and dynamic properties of the proteose-peptone fraction from bovine milk and whey protein concentrate. *International Dairy Journal*, 21(4), 222-228.

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.

Jing, H., y Nakamura, S. (2005). Production and use of Maillard products as oxidative stress modulators. *Journal of Medicinal Food*, 8(3), 291–298.

Kakade, M.L., Simons, N.R., Liener, I.E. y Lambert, J.W. (1972). *J. Agric. Food Chem.*, 20:87.

Kato, A. y Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochim. et Biophys. Acta (BBA) - Protein Structure*, 624, 1, 13-20.

Kato, A., Murata K. y Kobayashi., K. (1988). Preparation and characterization of ovalbumin–dextran conjugate having excellent emulsifying properties. *J Agric Food Chem* 36:421–425

Kato, A., Sasaki, Y., Furuta, R. y Kobayashi, K. (1990). Functional protein–polysaccharide conjugate prepared by controlled dryheating of ovalbumin–dextran mixture. *Agric Biol Chem* 54:107–112

## *Referencias*

- Kennedy, A.R. (1993). Anticarcinogenic activity of protease inhibitors. In *Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents*. Edited by Troll, W. & Kennedy, A. R., pp. 9-64, Plenum Press, New York, USA.
- Kennedy, A.R. (1998). The Bowman-Birk inhibitor from soybean as an anticarcinogen agent. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68 (Suppl.). 1406S-1412S.
- Kinsella, J.E. (1976) Functional properties of food proteins.: A review. *CRC Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 7, 219.
- Kinsella, J.E., Damodaran, S. y German B. (1985) Physicochemistry and function of oilseed protein. In *New Protein Foods*. Altschul, A.M., Wilcke, H.L. Eds. Academic Press. Orlando, FL, 5, chapter V, 108-117.
- Kishi K., Terai S., Shizuka FF., Dido Y. e Inoue G. (1987). Improvement of the protein quality of soybean whey. *Nutritional Science Soy Protein (Japan)*, 8, 70-75.
- Kitabatake, N., Tahara, M. y Doi, E. (1990). Thermal denaturation of soybean protein at low water contents. *Agric. Biol. Chem.* 54(9), 2205-2212.
- 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.
- Lakemond, C., de Jongh, H.J., Hessig, M. Gruppen, H. y Voragen, A. (2000). Soy glycinin : Influence of pH and ionic strenght on solubility and molecular structure at ambient temperatures. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1985-1990.
- Laura, J.C., Mar, V., Pedro, J., Martin, Al., Agustin, O. y Rosina, L.F. (2005). Effect of the dry-heating conditions on the glycosylation of  $\beta$ -lactoglobulin with dextran through the Maillard reaction. *Food Hydrocolloids* 19:831–837
- Lin, P. y Ng, T.B. (2008). A Stable Trypsin inhibitor from Chinese dull black soybeans with potentially exploitable activities. *Proc. Biochem.* 43, 993-998
- Liu, C., Wang, X., Ma, H., Zhang, Z., Gao, W. y Xiao, L. (2008). Functional properties of protein isolates from soybean stored under various conditions. *Food Chem.* 111, 29-37.
- Liu, K.S. (1999). *Soybeans chemistry, technology and utilization*. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers.
- Liu, W., Zhang, H.X., Wu, Z.L., Wang, Y.J. y Wang, L.J. (2013). Recovery of Isoflavone Aglycones from Soy Whey Wastewater Using Foam Fractionation and Acidic Hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 7366–7372.
- Losso J. N. (2008) The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor. *Critical Review of Food Science and Nutrition.* 48, 94-118.
- Lotan, R., Siegelman, H.W., Lis, H. y Sharon, N. (1974). Subunit structure of soybean agglutinin. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 1219–1224.

## *Referencias*

- Lowry, O.H., Rosebroug, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lucassen-Reynders, E.H. (1993). Interfacial viscoelasticity in emulsions and foams. *Food Structure*, 12, 1-12.
- Magnusson, E., Rosén, C. y Nilsson, L. (2011). Freeze-thaw stability of mayonnaise oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 25, 707-715.
- Marccone, M.F., Kakuda, Y. y Yada, R.Y. (1998) Immunochemical examination of the surface physico-chemical properties of various dicotyledonous and monocotyledonous globulin seed storage proteins. *Food Chem.* 63, 85-95.
- Márquez, A.L., Palazolo, G.G. y Wagner, J.R. (2005). Emulsiones tipo crema preparadas a base de leche de soja 1: Estudios de estabilidad y determinación de las formulaciones. *Grasas y Aceites Vol. 56. Fasc. 1*, pp 59-66.
- Martin, A. H., Bos, M.A. y van Vliet, T (2002). Interfacial rheological properties and conformational aspects of soy glycinin at the air/water interface. *Food Hydrocolloids*, 1663-71.
- Martínez Domínguez, B., Ibáñez Gómez, M.V. y Rincón León, F (2002). Acido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. *ALAN vol.52 N°3* Caracas.
- Matemu, A.O., Kayahara, H., Murasawa, H. y Nakamura, S. (2009). Importance of size and charge of carbohydrate chains in the preparation of functional glycoproteins with excellent emulsifying properties from tofu whey. *Food Chemistry*, 114: 1328-1334.
- Matemu, A.O., Katayama, S., Kayahara, H., Murasawa, H. y Nakamura, S. (2012). Improving Surface Functional Properties of Tofu Whey-Derived Peptides by Chemical Modification with Fatty Acids. *Journal of Food Science Vol. 00, Nr. 0* doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02631.x
- Matsue, S. Tomoyuki, F. y Miyawaki, O. (2001). Effects of water activity and aqueous solvent ordering on thermal stability of lysozyme,  $\alpha$ -chymotrypsinogen A, and alcohol dehydrogenase. *Int. J. Biol. Macromol.*, 28, 343-349.
- McClements, D.J. (1999). *Food Emulsiones. Principles, Practice and Techniques*. CRC Press, New York.
- McClements, D.J. (2004). Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 9, 305-313.
- Messina, M. (2004). La soja: valor nutricional y ron en la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas. En *Soja y Nutrición: Informe sobre el uso y la seguridad de la soja en la alimentación*. (Harris, S., Kovalskys, I., Musi, J. C. L. y Rubinstein, C., Editores), Buenos Aires. CDD 633.34: 613.2.
- Miroljub, B.B., Sladana, P.S., Snezana, T.J. y Mirjana, B.P. (2004). Soy protein modification- A review. *APTEFF*, 35, 3-16.
- Mitidieri, F.E. y Wagner, J.R. (2002). Coalescence of o/w emulsions stabilized by whey and isolate soybean proteins. Influence of thermal denaturation, salt addition and competitive interfacial adsorption. *Food Research International*. 35 (6), 547-557.



## Referencias

- Molina Ortiz, S.E. y Añón, M.C. (2001). Enzymatic Hydrolysis of Soy Protein Isolates. DSC study. *J. Therm. Anal. Calorim.* 66, 489-499.
- Mori, T., Utsami, S., Inaba, H., Kitamura, K., y Harada, K (1981). Differences in subunit composition of glycinin among soybean cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 20-23.
- Morgan, F., Léonil, J., Mollé, D. y Bouhallab, S. (1997). Nonenzymatic lactosylation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin under mild heat treatment leads to structural heterogeneity of the glycoforms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236, 413-417.
- Mujoo, R., Dianne, T.T. y Perry K.W., (2003) Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture. *Food Chemistry* 82, 265-273.
- Nakamura, S., Kato, A. y Kobayashi, K. (1991). New antimicrobial characteristics of lysozyme-dextran conjugate. *J Agric Food Chem* 39:647-650
- Nielson, N.C. (1985a). Structure of soy proteins. In A. M. Altshul, y H. L. Wilcke (Eds.), *New protein foods 5: seed storage proteins*. New York: Academic Press., 27.
- Nielson, N.C. (1985b). The structure and complexity of the 11S polypeptide in soybean. *Journal of American Oil Chemists Society*, 49, 2733-2740.
- Odani, S. e Ikenaka T. (1973). Scission of soybean Bowman-Birk proteinase inhibitor into 2 small fragments having either trypsin or chymotrypsin inhibitory activity. *Journal of Biochemistry*. 74, 857-560.
- Oliver, C.M., Melton, L.D. y Stanley, R.A. (2006). Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: a review. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 337-350.
- Oliver, C.M. (2011). Insight into the glycation of milk proteins: an ESI- and MALDIMS perspective (Review). *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 410-431.
- Oste, R.E., Brandon, D.L., Bates, A.H. y Friedman, M. (1990), Effect of Maillard browning reactions of the Kunitz soybean trypsin inhibitor on its interaction with monoclonal antibodies. *J. Agric. Food Chem.* 38, 258-261.
- Pallansch M.J. y Liener I.E. (1953). Soyin, a toxic protein from the soybean. II. Physical characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 45 (2), 366- 374.
- Pallarès, I., Vendrell, J., Avilès, F.X., y Ventura, S. (2004). Amyloid fibril formation by a partially structured intermediate state of  $\alpha$ -chymotrypsin. *Journal of Molecular Biology*, 342, 321-331.
- Palazolo, G.G, Mitidieri, F.E. y Wagner, J.R. (2003). Relationship between interfacial behaviour of native and denatured soybean isolates and microstructure and coalescence of oil in water emulsions-effects in salt and protein concentration. *Food Sci. Tech. Int.* 9(6), 409-419
- Palazolo, G.G, Sorgentini D.A. y Wagner J.R. (2004). Emulsifying properties and surface behavior of native and denatured whey soy proteins in comparison with other proteins. Creaming stability of oil-in water emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81: 625-632.

## Referencias

- Palazolo, G.G, Sorgentini D.A.y Wagner J.R. (2005). Coalescence and flocculation in o/w emulsions of native and denatured whey soy protein in comparison with soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 19, 595-604.
- Palazolo, G.G.; Sobral, P.A. y Wagner, J.R. (2011). Freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions prepared with native and thermally denatured soybean isolates. *Food Hydrocolloids*, 25, 3, 398-409.
- Pan, L.G., Tomás, M.C. y Añón, M.C. (2002). Effect of sunflower lecithins on the stability of water-in-oil and oil-in-water emulsions. *Journal of Surfactants and Detergents*. 5(2), 135-143
- Pavlath, A.E. y 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 B. J. F. Hudson (Ed.), *Developments in food proteins-2*. Essex, England: Applied Science Publishers. Cap. 2, 67–108.
- Petrucelli, S. y Añón, M.C. (1984). Relationship Between the Method of Obtention and the Structural and Functional-Properties of Soy Protein Isolates. 1. Structural and Hydration Properties. *J. Agric. Food Chem.* 42, 2161-2169.
- Petrucelli, S y Añón, M.C. (1995a). Soy Protein Isolate Components and Their Interactions *J. Agric. Food Chem.*, 1995, 43 (7), pp 1762–1767.
- Petrucelli, S., y Añón, M.C. (1995b) Thermal aggregation of soy protein isolates. *J. Agric. Food Chem*, 43, 3035-3041.
- Phimosiripol, Y., Siripatrawan, U., Tulyathan, V. y Cleland, D.J. (2008). Effects of freezing and thermal fluctuations during frozen storage on frozen dough and bread quality. *Journal of Food Engineering*, 84, 48-56.
- Pilosof, A.M.R. (2000). Propiedades de hidratación. En *Caracterización Funcional y Estructural de Proteínas*. Pilosof, A. M. R y Bartholomai, G. B. (Editores) 1<sup>era</sup> Edición EUDEBA. ISBN 950-23-1023-3, pp 17-23.
- Pusztai, A., Watt, W.B. y Stewart, J.C. (1991). A comprehensive scheme for the isolation of trypsin inhibitors and the agglutinin from soybean seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(5), 862–866.
- Rackis, J.J. (1981). *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 58: 503.
- Rawle, A. (2005). Basic principles of particle size analysis. Malvern Instruments Limited, technical paper.
- Relkin, P., y Sourdret, S. (2005). Factors affecting fat droplet aggregation in whipped frozen protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*, 19, 503-511.
- Ren, C., Tang, T., Zhang, M. y Guo, S. (2009). Interactions between whey soybean protein (WSP) and  $\beta$ -conglycinin (7S) during the formation of protein particles at elevated temperatures. *Food Hydrocolloids*, 23, 936–941.

## *Referencias*

- Riblett, A.L., Herald, T.J., Schmidt, K.A y Tilley K.A. (2001). Characterization of  $\beta$ -Conglycinin and glycinin soy protein fractions from four señectec soyben genotipes. *J. Agric. Food. Chem.* 49, 4983-4989.
- Romero, C.M., Albis, A.R. y Mendieta, N.E. (2011). Influence of 1-butanol, 1,2-butanediol and 1,2,3,4-butanetetrol on the adsorption of  $\beta$ -lactoglobulin at the air-water interface. *Rev. Colomb. Quim.* Vol.40, N° 3.
- Roos, Y.H. (1995). *Phase Transitions of Foods*. Academic Press, Inc: San Diego, USA.
- Ruíz-Henestrosa, V.P., Carrera Sánchez, C., Yust Escobar, M. M., Pedroche Jiménez, J.J., Millán Rodríguez, F. y Rodríguez Patino, J.M. (2007). Interfacial and foaming characteristics of soy globulins as a function of pH and ionic strength. *Colloids and Surface A: Physicochem. Eng. Aspects.* 309, 202-215.
- Schaafsma, G. (2000). The protein digestibility-corrected amino acids score, *J Nutr.* 130, 1865S-7S.
- Scilingo, A.A. y Añón, M.C. (1996). Calorimetric study of soybean proteins isolates: Effect of calcium and thermal treatments. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3751-3756.
- Scopes, R.A. (1982). *Protein Purification, Principles and practice*, by Springer-Verlag, NY Heidelberg Berlin, Cap. 3: 39-66.
- Scrimshaw, N.S. y Young V.R. (1979). In *Soy Protein and Human Nutrition*, Wilcke, H.L. Hopkins, D.T. y Waggle, D.H., Academic Press, New York, pp 121.
- Sessa, D.J. (1992). Hydration effects on the thermal stability of proteins in cracked soybeans and defatted soy flour. *Lebensm. Wiss. U.Technol.* 25, 365-370.
- Shen, L., y Tang, C-H. (2012). Microfluidization as a potential technique to modify surface properties of soy protein isolate. *Food Research International*, 48, 108- 118.
- Sheu, S.Y., Yang, D.Y., Selzle, H.L. y Schlag, E.W. (2003). Energetics of hydrogen bonds in peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(22), 12683–12687.
- Sipos, E.S. (1988). Edible uses of soybean protein. En *Proceedings of Soybean Utilization Alternatives Conference*, Center for Alternate Crops and Products, University of Minnesota. 57-95.
- Smulders, P.E., Caessens, P.W. y Walstra, P. (1999). Emulsifying properties of  $\beta$ -casein and its hydrolysates in relation to their molecular properties. En: E. Dickinson, y J.M. Rodriguez Patino (Eds.), *Food emulsions and foams (Interfaces, interactions and stability)* UK: The Royal Society of Chemistry., 61-69.
- Sobral, P.A. (2007). Tesina “Suero de soja liofilizado: Comportamiento y estabilidad” para optar al título de Magíster en Tecnología e Higiene de los alimentos. C.I.D.C.A. Facultad de Ciencias Exactas, U.N.L.P.
- Sobral, P.A. y Wagner, J.R. (2007a). Thermal properties of soybean whey and its protein. In *Functional Properties of Food Components*; Lupano, C. E. Ed.; Research Signpost: Kerala, India, 57-76.



## *Referencias*

- Sobral, P.A. y Wagner, J.R. (2007b) Estudio comparativo entre suero de soja y suero de tofu. Libro de actas del XI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2° Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. ISBN 978-987-22165-2-8; tomo 3 (Alimentos Origen Vegetal) Trabajo N° 23, 200-209.
- Sobral P.A. y Wagner J.R. (2009). Relación entre la composición y la actividad antitriptica de sueros de soja y el comportamiento térmico de sus proteínas Aisladas. En: Información Tecnológica. 20, 5, 65-73.
- Sobral, P.A, Palazolo, G.G y Wagner, J.R. (2010). Thermal behavior of soy proteins fractions depending on their preparation methods, individual interactions and storage conditions J. Agric. Food Chem. 58, 10092-10100.
- Sobral, P. A., Palazolo, G. G. y Wagner, J. R. (2011). Effect of water content on thermal behavior of freeze-dried soy whey and their isolated proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59 (8) 3950-3956.
- Song, Y., Babiker, E.E., Usui, M., Saito, A. y Kato, A. (2002).Emulsifying properties and bactericidal action of chitosan–lysozyme conjugates. Food Res Int 35:459–466
- Sorgentini, D.A., Wagner, J.R., Arrese, E.L. y Añón, M.C. (1991). Water imbibing capacity of soy protein isolates: Influence of protein denaturation. J. Agric. Food Chem. 39, 1386-1391.
- Sorgentini, D.A.; Wagner, J.R. y Añón, M.C. (1995). Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function relationships of soluble and insoluble fractions Journal of Agricultural and Food Chemistry. 43, 2471-2479
- Sorgentini, D.A. y Wagner, J.R. (1999). Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins. Journal of Food Biochemistry. 23 (5), 489-507.
- Sorgentini, D.A. y Wagner, J.R. (2002) Comparative study of foaming properties of whey and isolate soybean proteins. Food Research International, 35, 721-729.
- Staswick, P.E., Hermodson, M.A., y Nielson, N.C. (1984) Identification of cystines which link the acidic and basic components of glycinin subunits Journal of Biological Chemistry, 259, 13431-13435.
- Stein, H.H., Fuller, M.F. y Moughan, P.J. (2007). Definition of apparent, true, and standardized ileal digestibility of amino acids in pigs. Livestock science, v.109, pp.282-285.
- Tenorio, M.D., Espinosa-Martos, I., Préstamo, G. y Rupérez, P. (2010). Soybean whey enhance mineral balance and caecal fermentation in rats. Eur J. Nutr., 49, 155-163.
- Thanasukarn, P., Pongsawatmanit, R. y McClements, D.J. (2004a). Influence of emulsifier type on the freeze-thaw stability of hydrogenated palm oil-in-water emulsions. Food Hydr. 18, 1033-1043.
- Thanasukarn, P., Pongsawatmanit, R. y McClements, D.J. (2004b). Impact of fat and water crystallization on the stability of hydrogenated palm oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. 246, 49-59.
- Tomosatsu, H. (1994). Health effects of Oligosaccharides Food Technology October 1994, 61-65.



## Referencias

- Tonnellier, A.C. (1913). La soja hispida: año 1912. Tema agricultura-soja. Ministerio de Agricultura de la Nación. Establecimiento Tipográfico J. Carbone, Buenos Aires, 14 p. Obras encuadernadas juntas. Ubicación SA 027-06-029.
- Turner, R.H. y Liener, I.E. (1975). *J. Agric. Food Chem.*, 23:184.
- Utsami, S (1992) Plant food protein engineering. En J. E. Kinsella (Ed), *Advances in food and nutrition reaserch* San Diego CA: Academic Press, 89-208.
- Utsami, S., Matsuma, Y., y Mori, T. (1997). Structure-function relationships of soy proteins. In S Damodaran, y A. Paraf (Eds), *Food proteins and their applications* New York: Dekker., 257-291.
- Valentas, K.J., Levine, L. y Clark, J.P. (1991). Soy complex, In *Food Processing Operations and Scale-Up*, . pp. 92 137, New York, Marcel Dekker, Inc.
- 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. 19.
- Wagner, J.R. y Guéguen, J (1999a) Surface functional properties of native, acid-treated, and reduced soy glycinin. 1. Foaming properties. *Journal of Agric Food Chem.* 47(6), pp2173-2180.
- Wagner, J.R. y Guéguen, J (1999b) Surface functional properties of native, acid-treated, and reduced soy glycinin. 2. Emulsifying properties. *Journal of Agric Food Chem.* 47(6), pp 2181-2187.
- Wagner, J.R.; Sorgentini, D.A. y Añón, M.C. (1996). Thermal and electrophoretic behavior, hydrophobicity, and some functional properties of acid-treated soy isolates *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1881-1889
- Wagner, J.R.; Sorgentini, D.A. y Añón, M.C. (2000). Relation between solubility and surface hydrophobicity as an indicator of modifications during preparation processes of commercial and laboratory prepared soy protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3159-3165.
- Walstra P. (1983). Formation of emulsion, en *Encyclopedia of Emulsion Technology: Basic Theory*. Becher, P. (ed.), Marcel Dekker Inc., New York. pp. 57-127.
- Wang L.C. (1971) Isoelectric point differences in commercial soybean trypsin inhibitors *Cereal Chemistry*, 48, 303-311.
- Weast, R.C. (1986). *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 67<sup>th</sup> ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Yamauchi, F., Yamagishi, T. y Iwabuchi, S. (1991). Molecular understanding of heat induced phenomena of soybean protein. *Food Reviews International*. 7(3), 283-322
- Yavelow, J. Collins, J. Birk, Y. Troll, W. y Kennedy, A.R. (1985) Nan molar concentrations of Bowman-Birk soybean protease inhibitor suppress X-ray induced transformation in vitro. *Proceeding of National Academy of Sciences*, 82, 5395-5399.

## *Referencias*

Yuwono, S.D. y Kokugan, T. (2008) Study of the effects of temperature and pH on lactic acid production from fresh cassava roots in tofu liquid waste by *Streptococcus bovis*. *Biochemical Engineering Journal* 40, 175–183.

Zhong Z.K. y Sun X. S. (2000) Thermal behavior and nonfreezing water of soybean protein components. *Cereal Chem.*, 77, 495-500.

Zhu D, Damodaran S y Lucey JA (2010). Physicochemical and emulsifying properties of whey protein isolate (WPI)-dextran conjugates in aqueous solutions. *J Agric Food Chem* 58:2988–2994.

Zhuo XY., Qi, JR., Yin SW., Yang XQ., Zhu JH. y Huang LX (2013) Formation of soy protein isolate-dextran conjugates by moderate Maillard reaction in macromolecular crowding conditions. *J Sci Food Agric.* 93(2):316-23.