



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

***Trabajo de Tesis Doctoral***

***“Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre propiedades fisicoquímicas y bioquímicas y estabilidad física de diferentes sistemas preparados con proteínas de soja y minerales”***

---

***Tesista: Carlos Alberto Manassero***

***Director: Francisco Speroni***

***Director: Sergio Ramón Vaudagna***

***Año: 2016***



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Ciencias Biológicas

Trabajo de Tesis Doctoral

**Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre  
propiedades fisicoquímicas y bioquímicas y  
estabilidad física de diferentes sistemas  
preparados con proteínas de soja y minerales**

Tesista: Lic. Carlos Alberto Manassero

Directores: Dr. Francisco Speroni

Dr. Sergio R. Vaudagna

Año 2016

La utopía está en el horizonte.  
Me acerco dos pasos, ella se aleja dos pasos.  
Camino diez pasos y el horizonte se desplaza diez pasos más allá.  
Por mucho que camine, nunca la alcanzaré.  
Entonces, ¿para qué sirve la utopía?  
Para eso: sirve para caminar.

Eduardo Galeano

Dedicado a mi Familia

Siempre es temprano para rendirse.

Norman Vincent Peale

El presente trabajo, para optar por el grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Instituto Tecnología de Alimentos del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CNIA) de INTA y en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (Facultad de Ciencias Exactas, UNLP – CONICET) bajo la dirección de los Doctores Francisco Speroni y Sergio R. Vaudagna. Parte de los estudios fueron desarrollados en el *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA)-Centro Nantes-Angers y en ONIRIS, *École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de L'alimentation*, Nantes, Francia.



Ministerio de Agroindustria  
Presidencia de la Nación



### **Quisiera dar las gracias ...**

A la Universidad Nacional de La Plata, pública y gratuita, que me permitió formarme con un alto nivel académico.

A CONICET y al programa Bec.Ar. que con sus becas me permitieron llevar adelante esta investigación.

A las autoridades, personal técnico y administrativo del CIDCA, ITA-INTA Castelar e INRA-Nantes.

A mis directores Francisco y Sergio, dos grandes profesionales y mejores personas. Por haber confiado en mí, por brindarme todo su apoyo y por ayudarme en mi crecimiento. Hemos formado un lindo grupo de trabajo y fue un placer realizar la Tesis con ustedes.

A la Dr. Cristina Añón por su invaluable ayuda compartiendo todo su conocimiento.

Al Dr. Marc Anton y a la Dr. Marie de Lamballerie por abrirme las puertas de sus laboratorios y por permitirme desarrollar parte de mi tesis bajo su supervisión. Aprendí y crecí mucho junto a ustedes.

A Valérie y Elisabeth, dos personas estupendas que hicieron que la distancia a mis afectos sea menos dolorosa. Por todos los hermosos momentos vividos ¡*merci!!!*

A mis queridísimos compañeros y amigos de cátedra: Mati, Fede, Laurita, Pablo, Andrew, Caro, Myriam, Agus, Gaby, Romina. Gracias “Comisión 5” por el aguante, especialmente en este último mes.

A Anita, Ceci, Juli y el “Kity”. Empezamos como compañeros de laboratorio y terminamos con una linda amistad.

A las grandes personas que conforman el grupo “Proteínas y Anexos”, por compartir hermosos momentos.

A la gente linda de la Facultad de Medicina: Boris, Nella, Maggie, Sandra, Juampi, Moni. Por más que no nos veamos seguido, tengo los mejores recuerdos de aquella gran etapa.

Al lindo grupo del Instituto Tecnología de Alimentos, por recibirme y tratarme de forma tan cálida.

A Claudio Sanow por ayudarme en las innumerables corridas con el equipo de altas presiones. Por su cordialidad y buena predisposición siempre que lo necesité.

A Ana Sancho por su ayuda en la obtención de las superficies de respuesta.

A Diana por ayudarme con la búsqueda bibliográfica.

A Natalia Bourdet y Liliana Kunz por su buena onda.

A la Dr. María Julia Martínez por su ayuda en las determinaciones de potencial- $\zeta$ .

A Margarita y Noemí, dos personas a las que le debo mucho. Ellas saben que es así.

**A Nati. Por darme todo su amor, por acompañarme, escucharme, tranquilizarme. Por bancarse mis cambiantes estados de humor y estar a mi lado en todo momento. Por hacerme feliz.**

A mi abuela, por ser totalmente responsable de la persona que soy, por educarme con su ejemplo, por su inmenso amor, por todo lo que me diste y me das a diario. Siempre estaré en deuda.

A mi abuelo, por regalarme los mejores recuerdos que tengo de pequeño, por ser cómplice en las tardes de fútbol, por enseñarme como debe ser un hombre, por haber sido mi ejemplo a seguir. Por caminar a mi lado en las buenas y por cargarme en las malas.

A Sole, mi hermana. Por estar siempre a mi lado y por demostrarme su amor incondicional. Por haberme regalado, junto a Juan, los tres tesoros más grandes que tengo: mis ahijados Valentino, Joaquín “el colo” e Ignacio “el colito”.

A “Valen”, “Colo” y “Colito”. Porque sin saberlo me cambiaron la vida, porque iluminan mis mañanas, mis tardes y mis noches con su mirada. Porque son una parte de mí y porque los amo con todo el corazón. Por ser mi cable a tierra, por regalarme el amor más puro y sincero.

A Silvia, mi madre. Imposible resumir en escasos renglones toda una vida de agradecimiento. Gracias por estar siempre, por ser un generador de fuerza inagotable. Gracias mamá.

A todos, los que sin ser mi intención, me olvidé de mencionar.

A Dios por mostrarme el camino una y otra vez. Por ayudarme a levantar cada vez que caí. Por regalarme vida para disfrutar de la gente que amo.

## **Antecedentes**

Los resultados presentados están parcialmente incluidos en los trabajos que se detallan a continuación:

Carlos A. Manassero, Sergio R. Vaudagna, Ana María Sancho, María Cristina Añón, Francisco Speroni. **Combined high hydrostatic pressure and thermal treatments fully inactivate trypsin inhibitors and lipoxygenase and improve protein solubility and physical stability of calcium-added soymilk.** Enviado el 2 de febrero de 2016 a *Innovative Food Science and Emerging Technologies* para su consideración. Actualmente se encuentra en etapa de revisión.

Carlos A. Manassero, Sergio R. Vaudagna, María Cristina Añón, Francisco Speroni. **High hydrostatic pressure improves protein solubility and dispersion stability of mineral-added soybean protein isolate.** *Food Hydrocolloids*, 43 (2015), 629-635.

Comunicaciones en formato resumen y poster:

8<sup>th</sup> International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, 15-18 de Julio de 2014, Nantes, Francia. **“High hydrostatic pressure improves protein solubility and dispersion stability of calcium-added soybean proteins”.** Manassero Carlos, Vaudagna Sergio R., Anton Marc, de Lamballerie Marie, Añón María Cristina and Speroni Francisco.

International Nonthermal Food Processing Workshop, Florianópolis – Santa Catarina, Brazil 2013. **“Effects of high hydrostatic pressure treatment on the soybean proteins – minerals interaction”.** Manassero Carlos, Añón María Cristina, Vaudagna Sergio and Speroni Francisco.

**IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba 2012 (CICYTAC 2012)**, 14-16 de Noviembre de 2012, Pabellón Argentina, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. **“Efectos del tratamiento con alta presión hidrostática sobre la interacción proteínas de soja-minerales”.** Manassero Carlos Alberto, Añón María Cristina, Vaudagna Sergio, Speroni Francisco.

## Índice

I. Soja: proteínas y productos derivados	1
I.I. Generalidades	1
I.II. Proteínas de soja	2
I.III. Alimentos líquidos	3
I.III.I. Leche de soja	4
I.III.II. Bebida sin alcohol formulada con jugo de durazno y aislado de proteínas de soja y adicionada con calcio	5
II. Nuevas tecnologías de procesamiento de alimentos	7
II.I. Tecnología de Altas Presiones Hidrostáticas (APH)	7
II.II. Principios involucrados en el procesamiento con APH	11
II.III. Descripción del proceso y de los equipos	15
II.IV. Principales parámetros del proceso	21
II.V. Requisitos del envase	24
II.VI. Efecto de las APH sobre reacciones químicas y componentes de los alimentos	25
Objetivos	32
1.1. Materiales y métodos	33
1.1.1. Preparación de aislado proteico de soja	33
1.1.2. Caracterización molecular de APS mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	33
1.1.2.1. Reactivos	34
1.1.2.2. Metodología	34
1.1.2.3. Coloración	35
1.1.2.4. Obtención de las imágenes y análisis de los geles	35
1.1.3. Preparación de dispersiones de APS adicionadas con minerales	35
1.1.4. Tratamiento con altas presiones hidrostáticas (APH)	36
1.1.5. Diseño experimental	36
1.1.6. Solubilidad	36
1.1.6.1. Dispersiones adicionadas con calcio o magnesio	36
1.1.6.2. Dispersiones adicionadas con hierro	37
1.1.6.3. Determinación de solubilidad proteica	37
1.1.7. Determinación del potencial- $\zeta$	38
1.1.7.1. Metodología	40
1.1.8. Determinación de la concentración de calcio libre	42

1.1.8.1. Metodología	43
1.1.9. Análisis de estabilidad física	43
1.1.9.1. Metodología	45
1.1.10. Análisis estadístico	45
1.2. Resultados y discusión	46
1.2.1. Caracterización molecular de APS mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	46
1.2.2. Efecto del tratamiento con APH sobre la solubilidad proteica de dispersiones de APS adicionadas con CaCl <sub>2</sub> , MgCl <sub>2</sub> o FeSO <sub>4</sub> a pH 7,0	47
1.2.3. Efecto del tratamiento con APH sobre la solubilidad de dispersiones de APS adicionadas con CaCl <sub>2</sub> a diferentes valores de pH	49
1.2.4. Efecto del tratamiento con APH sobre el potencial- $\zeta$ de dispersiones de APS adicionadas con CaCl <sub>2</sub> a diferentes valores de pH	51
1.2.5. Efecto del tratamiento con APH sobre la concentración de calcio libre en dispersiones de APS a diferentes valores de pH	53
1.2.6. Efecto del tratamiento con APH sobre la estabilidad física de dispersiones de APS	56
1.3 Conclusiones del Capítulo I	63
2.1. Introducción	64
2.1.1. Fenómenos de superficie	64
2.1.1.1. Moléculas tensioactivas en la interfase	65
2.1.1.2. Cinética de adsorción de una proteína	66
2.1.1.3. Reología interfacial: deformaciones interfaciales dilatacionales	67
2.1.2. Emulsiones	68
2.1.2.1. Formación de la emulsión	70
2.1.2.2. Maduración de la interfase	72
2.1.2.3. Desestabilización de las emulsiones	72
2.1.2.3.1. Cremado	73
2.1.2.3.2. Floculación	74
2.1.2.3.3. Coalescencia	77
2.2. Materiales y métodos	80
2.2.1. Caracterización fisicoquímica de dispersiones de APS utilizadas para preparar emulsiones o/w	80
2.2.1.1. Preparación de APS	80
2.2.1.2. Preparación de dispersiones de APS	80

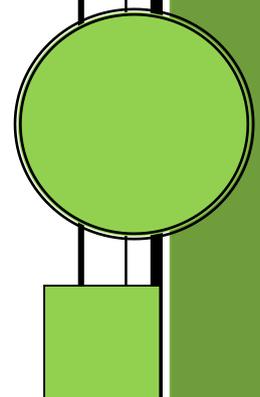
2.2.1.3. Tratamiento con APH	81
2.2.1.4. Diseño experimental	81
2.2.1.5. Determinación de solubilidad proteica	82
2.2.1.6. Determinación de turbidez	83
2.2.1.7. Análisis de distribución de tamaño de agregados	83
2.2.1.7.1. Metodología	84
2.2.1.8. Determinación del potencial- $\zeta$	85
2.2.1.9. Curvas de presión superficial en la balanza de Langmuir:	
adsorción en interfase aire/líquido	85
2.2.1.9.1. Método de la placa de Wilhelmy	85
2.2.1.9.2. Balanza de Langmuir	86
2.2.1.9.3. Metodología	87
2.2.1.10. Tensiometría de gota dinámica y reología interfacial	88
2.2.1.10.1. Tensiometría de gota dinámica	88
2.2.1.10.2. Reología interfacial	90
2.2.1.10.2.1. Metodología	90
2.2.2. Caracterización de emulsiones o/w preparadas a partir de	
dispersiones de APS.	91
2.2.2.1. Preparación de las emulsiones	91
2.2.2.2. Distribución del tamaño de partícula	92
2.2.2.2.1. Principio	92
2.2.2.2.2. Metodología	93
2.2.2.2.3. Tratamiento de los resultados	93
2.2.2.3. Obtención de imágenes mediante microscopía óptica	93
2.2.2.4. Determinación del índice de floculación	94
2.2.2.5. Cuantificación y caracterización molecular de proteína	
adsorbida en la interfase	94
2.3. Resultados y discusión	96
2.3.1. Caracterización fisicoquímica de dispersiones de APS	
utilizadas para preparar emulsiones o/w	97
2.3.1.1. Determinación de solubilidad proteica	97
2.3.1.2. Determinación de turbidez	99
2.3.1.3. Determinación del potencial- $\zeta$	104
2.3.1.4. Análisis de distribución de tamaño de agregados	106
2.3.1.5. Curvas de presión superficial en la balanza de Langmuir:	
adsorción en interfase aire/líquido	112

2.3.1.5.1.A pH 5,9	112
2.3.1.5.2.A pH 7,0	114
2.3.1.5.3.Estructura del film interfacial	116
2.3.1.6. Estudio de la reología interfacial por reología dilatacional	117
2.3.2. Caracterización de emulsiones o/w	120
2.3.2.1. Formación de las emulsiones (tiempo 0). Distribución del tamaño de partícula y microestructura	120
2.3.2.1.1.Emulsiones obtenidas a partir de dispersiones de APS 5 g de proteína.L <sup>-1</sup> , pH 5,9	120
2.3.2.1.2.Emulsiones obtenidas a partir de dispersiones de APS 5 g de proteína.L <sup>-1</sup> , pH 7,0	123
2.3.2.1.3.Emulsiones obtenidas a partir de dispersiones de APS 10 g de proteína.L <sup>-1</sup> , pH 5,9	127
2.3.2.1.4.Emulsiones obtenidas a partir de dispersiones de APS 10 g de proteína.L <sup>-1</sup> , pH 7,0	130
2.3.3. Estabilidad de las emulsiones	135
2.3.3.1. Evolución del índice de floculación en emulsiones obtenidas a partir de dispersiones de APS 5 g de proteína.L <sup>-1</sup>	136
2.3.3.2. Evolución del índice de floculación en emulsiones obtenidas a partir de dispersiones de APS 10 g de proteína.L <sup>-1</sup>	136
2.3.4. Cuantificación y caracterización molecular de proteína adsorbida en la interfase	138
2.3.4.1. Determinación del porcentaje de proteína adsorbida	138
2.3.4.2. Determinación de la concentración de proteína interfacial	139
2.3.4.3. Caracterización molecular de proteína adsorbida en la interfase	141
2.3.4.3.1.Emulsiones obtenidas a partir de dispersiones de APS 5 g de proteína.L <sup>-1</sup>	141
2.3.4.3.2.Emulsiones obtenidas a partir de dispersiones de APS 10 g de proteína.L <sup>-1</sup>	142
2.4. Conclusiones del Capítulo II	145
3.1. Materiales y métodos	147
3.1.1. Diseño experimental: optimización mediante la metodología de superficie de respuesta, aplicando red de Doehlert	147
3.1.2. Preparación de leche de soja	150
3.1.3. Preparación y tratamiento de las muestras	151

3.1.4. Determinación de solubilidad proteica	155
3.1.5. Porcentaje de inactivación de la enzima lipoxigenasa (%LOX)	155
3.1.6. Porcentaje de inactivación de factores antitripticos (%IFA)	156
3.1.7. Comparación entre diversas condiciones de proceso	158
3.1.7.1. Determinación de la viscosidad aparente	159
3.1.7.1.1. Metodología	159
3.1.7.2. Análisis de estabilidad física	160
3.1.7.2.1. Metodología	160
3.2. Resultados y discusión	161
3.2.1. Efecto sobre solubilidad proteica	161
3.2.2. Efecto sobre la inactivación de la enzima lipoxigenasa	164
3.2.3. Efecto sobre la inactivación de los factores antinutricionales	164
3.2.4. Optimización de los factores de proceso utilizando la función deseabilidad	166
3.2.5. Comparación entre diversas condiciones de proceso	168
3.2.5.1. Efecto sobre %SP, %LOX y %IFA	169
3.2.5.2. Determinación de la viscosidad aparente	170
3.2.5.3. Análisis de estabilidad física	172
3.3. Conclusiones del Capítulo III	176
3.4. Anexo Capítulo III	177
4.1. Materiales y métodos	179
4.1.1. Obtención del jugo de durazno	179
4.1.2. Formulación de la bebida	179
4.1.3. Obtención de la bebida	180
4.1.4. Preparación y tratamiento de las muestras	180
4.1.5. Determinación de solubilidad proteica	180
4.1.6. Análisis de estabilidad física	181
4.1.7. Determinación de la viscosidad aparente	181
4.1.8. Determinación de los parámetros cromáticos	181
4.1.9. Análisis estadístico	182
4.2. Resultados y discusión	183
4.2.1. Determinación de solubilidad proteica	183
4.2.2. Análisis de estabilidad física	184
4.2.3. Determinación de la viscosidad aparente	188
4.2.4. Determinación de los parámetros cromáticos	190

4.3. Conclusiones del Capítulo IV	193
Conclusiones generales	194
Referencias bibliográficas	196

# INTRODUCCIÓN GENERAL



## I. Soja: proteínas y productos derivados

### I.I. Generalidades

La soja (*Glycine max* L.) es un miembro importante de las leguminosas y ha sido cultivada por más de 3000 años en China y otros países asiáticos, como Japón y Corea. Estados Unidos es el primer productor mundial seguido por Brasil y Argentina (Kitamura, 2010). En los países asiáticos la soja constituye una importante fuente de proteínas y se la consume de muchas formas como *tofu* (coagulo de soja no fermentado), *miso* (pasta de soja fermentada), *natto* (semilla de soja fermentada), *aburaage* (*tofu* frito), *snacks*, leche de soja, bebidas en base a soja, entre otros. Debido a los potenciales efectos benéficos para la salud, el consumo de alimentos en base a soja se ha incrementado en las últimas dos décadas, principalmente en los países occidentales. Entre ellos se pueden mencionar efectos hipocolesterolémicos, hipotensivos, anticarcinogénicos, antioxidantes, inmunomoduladores (Makino *et al.* 1988; Kwon *et al.* 2002; Xiao, 2011). Uno de los factores que influyó notablemente en el interés y consumo de este tipo de alimentos fue la aprobación del alegato de salud por la FDA (del inglés *Food and Drug Administration*) en los EEUU en el cual se sostiene que el consumo de proteínas de soja, como parte de una dieta baja en grasas saturadas y colesterol, disminuye el riesgo de enfermedades cardíacas. Similares alegatos de salud fueron aprobados en otros países como Japón, Reino Unido, Sudáfrica, Brasil, Corea, Filipinas, Indonesia (Xiao, 2008). A su vez, las semillas de soja presentan un alto contenido proteico (35 - 40 %, expresado en base seca) con un elevado valor nutricional, al presentar un excelente balance aminoacídico. Esto las convierte en una fuente importante de proteínas de bajo costo para el consumo humano (Derbyshire, Wright & Boulter, 1976). No menos importantes son sus excelentes propiedades funcionales (Utsumi, Matsumura & Mori, 1997; Tsumura *et al.* 2005; Traynham *et al.* 2007), las que se modifican de acuerdo al tratamiento al que son expuestas (Molina, Papadopoulou & Ledward, 2001; Puppo *et al.* 2004; Puppo *et al.* 2005). De esta manera las proteínas de soja adquieren un gran valor comercial debido a la posibilidad de usarlas en el desarrollo de una gran variedad de nuevos productos.

En Argentina la soja es el principal cultivo del país, con un volumen de producción que en las cosechas 2010-2011 y 2011-2012 osciló entre los 40 y 50 millones de toneladas. A su vez es el principal componente exportador, comercializándose como grano entero, harina desgrasada y aceite. El consumo interno de la harina de soja en la Argentina está destinado principalmente al consumo animal, mientras que una pequeña fracción del aceite de soja se

destina a la producción de *biodiesel* (MAGyP, 2014). A su vez, una pequeña fracción del volumen producido se destina a la elaboración de bebidas. Esta comercialización de la soja con poco valor agregado nos plantea la posibilidad de revalorizar el cultivo a través del desarrollo de productos con propiedades mejoradas tanto para el abastecimiento interno como el externo.

### I.II. Proteínas de soja

Las proteínas de soja se clasifican sobre la base de su solubilidad en albúminas (solubles en agua) y globulinas (solubles en soluciones salinas). La fracción globulinas está compuesta principalmente por las denominadas globulinas 7S y 11S de acuerdo a sus constantes de ultracentrifugación, representando aproximadamente un 30 % y un 40 % del total de las globulinas, respectivamente (Utsumi, 1992; Utsumi, Matsumura & Mori, 1997). La globulina 7S o  $\beta$ -conglucina es una glicoproteína trimérica formada por tres subunidades (entre paréntesis figura la masa molecular aproximada):  $\alpha$  ( $\approx$  68 kDa),  $\alpha'$  ( $\approx$  72 kDa) y  $\beta$  ( $\approx$  52 kDa) (Than & Shibasaki, 1976, 1978). Por su parte, la glicinina o globulina 11S es hexamérica. Los hexámeros están formados por subunidades de masa molecular aproximada entre 50 y 70 kDa que se mantienen unidos entre sí por interacciones no covalentes. Cada una de las subunidades, a su vez, se encuentran conformadas por un polipéptido ácido (A) que puede presentarse bajo distintas formas entre aproximadamente 30 y 40 kDa y un polipéptido básico (B) de aproximadamente 20 kDa unidos entre sí por un enlace disulfuro (Badley *et al.* 1975; Nielsen, 1985).

La fracción albúmina está compuesta por lipoxigenasa (102 kDa),  $\beta$ -amilasa (61,7 kDa), lectina (33 kDa) y los inhibidores de tripsina: de Bowman-Birk (8 kDa) y el de Kunitz (20 kDa) (Koshiyama, Kikuchi & Fukushima, 1981; Rackis, Wolf & Baker, 1986; Iwabuchi & Yamauchi, 1987). Ambos inhibidores son estables frente a ciertos tratamientos térmicos debido a la presencia de enlaces disulfuro en sus moléculas: dos para el inhibidor de Kunitz (Koide & Ikenaka, 1973) y siete para el de Bowman-Birk (Odani, Koide & Ikenaka, 1972), siendo este último el de mayor estabilidad térmica (Dipietro & Liener, 1989). En relación a esto Sorgentini y Wagner (1999) determinaron la temperatura de desnaturalización del inhibidor de Kunitz en agua (76 °C), encontrando dos endotermas a 77 y 110 °C para el de Bowman-Birk. A su vez presentan alta solubilidad a pH 4,5 (Utsumi, Matsumura & Mori, 1997), valor al cual se realiza la separación, por precipitación isoelectrica, de las globulinas y las albúminas en la obtención de los aislados proteicos de soja (APS). Los APS son ampliamente utilizados en la industria alimentaria debido a sus propiedades físico-químicas

y de superficie, tales como su capacidad emulsificante, gelificante y espumante, entre otras (Nishinari *et al.* 2014).

### I.III. Alimentos líquidos

Durante los últimos años los consumidores han tomado conciencia de la relación que existe entre la alimentación y la salud. Esto impulsa una demanda creciente de productos que mantengan las características nutricionales y sensoriales de los alimentos frescos. La industria alimentaria busca satisfacer la demanda diversificando sus productos mediante la preparación de nuevos alimentos, mejorando sus atributos sensoriales y sus propiedades nutricionales y funcionales (Sakhale, Pawar & Ranwver, 2012). En este aspecto, se han desarrollado una gran variedad de alimentos líquidos listos para beber en base a vegetales y leche. A su vez, las bebidas mixtas en base a soja (Cilla *et al.* 2012; Kale *et al.* 2012) han cobrado gran atención y popularidad en todo el mundo. A partir de cambios en los hábitos de consumo de la población por la aparición de nuevas tendencias, preferencias o problemas de intolerancia o alergia a algún componente alimentario se pone en riesgo el desarrollo de una dieta equilibrada, con aportes suficientes de nutrientes esenciales que eviten la aparición de enfermedades asociadas a su deficiencia. En este sentido, el desarrollo de alimentos líquidos adicionados con ciertos minerales, como calcio, magnesio o hierro, con importantes funciones fisiológicas es un tópico de importancia actual.

El calcio es un mineral nutricionalmente esencial que desempeña un rol crítico en una gran variedad de procesos: proporciona el esqueleto humano rigidez, dureza y fuerza para soportar, por ejemplo, las contracciones musculares, la gravedad o los traumatismos. También juega un papel metabólico importante en la facilitación de la contracción muscular, coagulación de la sangre, actividad enzimática, función sináptica nerviosa, mensajeros secundarios, liberación de hormonas y permeabilidad de membrana. El calcio es tan importante para los procesos fisiológicos del cuerpo que su concentración en el líquido extracelular (suero) se mantiene dentro de un rango muy estrecho. Si la ingesta dietética de calcio es baja, el cuerpo moviliza el calcio a partir de tejido esquelético, un depósito de calcio dinámico, para mantener los niveles de calcio en el suero. Finalmente, una ingesta insuficiente de calcio crónica conduce, en última instancia, a una disminución de la masa ósea, desarrollo de osteoporosis, y un mayor riesgo de fracturas por fragilidad (Sacco & L'abbé, 2016).

El magnesio también es un mineral esencial que debe ser obtenido a partir de la dieta. Es fundamental para la función del ATP (trifosfato de adenosina), actúa como co-factor de

más de 300 enzimas, es importante para la estabilización de proteínas y la membrana plasmática, es necesario para la síntesis de ácido nucleico e interactúa con algunos receptores de las células. A su vez participa en la regulación del flujo de iones necesario para mantener el equilibrio osmótico. De esta manera, cambios en la concentración de magnesio puede conducir a una serie de alteraciones a nivel celular, las cuales llevarían a disfunciones y enfermedades graves (Mazur & Maier, 2016).

El hierro forma parte del grupo hemo, una macromolécula heterocíclica con importantes funciones en el organismo (Latunde-Dada, 2016). Es esencial en el cuerpo para muchos procesos fisiológicos incluyendo el transporte de oxígeno a los tejidos, la producción de ARN mensajero y proteínas a partir del ADN y la regulación del metabolismo energético. Una baja ingesta de hierro a través de la dieta puede conducir a anemia y comprometer el transporte de oxígeno (Coad, Stewart & Pedley, 2016).

Las leches de soja y las bebidas a base de proteínas de soja adicionadas con jugo de fruta resultan una gran alternativa para vehiculizar estos importantes minerales. Es importante destacar que en alimentos líquidos que contienen proteínas la solubilidad y los fenómenos de agregación son características cruciales que limitan algunos usos o la incorporación de nutrientes como calcio, magnesio o hierro, ya que en general los iones divalentes de dichos minerales forman complejos insolubles con las proteínas de soja (Ono, Katho & Mothizuki, 1993). Por lo tanto, es indispensable estudiar el efecto que puedan tener las Altas Presiones Hidrostáticas (APH) sobre estos sistemas, intentando dilucidar los mecanismos involucrados de manera de alcanzar el éxito en el desarrollo de estos tipos de alimentos.

#### I.III.I. Leche de soja

Las leches de soja constituyen una bebida alternativa muy interesante a la leche de vaca especialmente para personas que presentan alergia a sus proteínas o intolerancia a la lactosa. Son consideradas bebidas saludables dado su alto valor nutricional, contienen aproximadamente la misma proporción de proteína que la leche de vaca. Sin embargo, contienen una menor concentración de calcio que la leche de vaca (20 – 30 mg/100 mL *vs.* 120 mg/100 mL) (Chaiwanon *et al.* 2000; Pathomrungsriyounggul, Grandison & Lewis, 2007; Pathomrungsriyounggul, Grandison & Lewis, 2012). Sin embargo, como se indicó en los párrafos previos, la adición de calcio a las leches de soja representa un problema tecnológico debido a la tendencia que tienen las proteínas de soja a interactuar con iones divalentes (Appu Rao & Narasinga Rao, 1975; Pathomrungsriyounggul, Grandison & Lewis,

2007) provocando su agregación y desestabilización. Se han utilizado, tanto en la formulación de leches como en bebidas de soja, distintas estrategias para lograr la estabilidad del sistema, como la adición de agentes secuestrantes de calcio o la encapsulación de iones divalentes (Yazici *et al.* 1997; Pathomrungruangsyounggul, Lewis and Grandison, 2010). Sin embargo, la tendencia actual es reducir el uso de aditivos (estabilizantes, preservantes, entre otros) en los alimentos (Bolumar, Georget & Mathys, 2015). A su vez, los agentes secuestrantes pueden presentar efectos adversos sobre algunas características del producto. Así, Chaiwanon *et al.* (2000) describieron que el uso de citrato de potasio produce un regusto desagradable, que puede ser eliminado por combinación con carragenano como estabilizante, pero informaron que el carragenano disminuiría la biodisponibilidad del calcio. Los secuestrantes también disminuyen la viscosidad de la leche de soja por disminuir el grado de agregación proteica (Yazici *et al.* 1997). Pathomrungruangsyounggul, Lewis y Grandison (2010) encontraron que agentes secuestrantes como el EDTA reducen el pH, lo que lleva a un aumento de la coagulación y de la sedimentación luego de la pasteurización térmica. Por estos motivos la aplicación de APH resulta una posibilidad muy interesante para explorar su efecto sobre la reversión de insolubilidad en las leches o bebidas en base a soja, por causa de la incorporación de sales de iones divalentes.

La leche de soja es una emulsión aceite en agua, en la cual la fase continua está formada por una compleja dispersión proteica (Cruz *et al.* 2007). Los métodos habituales para la preparación de las leches de soja suelen incluir una etapa de remojado de los porotos, seguido de homogenización y tratamiento térmico y finalmente una filtración para eliminar los restos no dispersables que constituye el *okara* (Chaiwanon *et al.* 2000; Chen, 2006; Pathomrungruangsyounggul, Grandison & Lewis, 2007). A diferencia de los aislados proteicos de soja, donde el contenido de LOX y de los factores antinutricionales es bajo ya que se pierden con el resto de las albúminas, en las leches de soja su contenido es elevado dado que se preparan a partir del poroto entero. En este sentido, el tratamiento térmico tiene como finalidad, además de la pasteurización, la eliminación de LOX y de los factores antitripticos de Kunitz y de Bowman-Birk.

#### I.III.II. Bebida sin alcohol formulada con jugo de durazno y aislado de proteínas de soja y adicionada con calcio

Los jugos de fruta constituyen sistemas heterogéneos complejos en los cuales grandes partículas insolubles, materiales supra-coloidal y coloidal se encuentran dispersos en un

medio continuo rico en compuestos solubles: azúcares, ácidos orgánicos, pectinas, compuestos fenólicos y sales. La fase dispersa está principalmente compuesta de fragmentos de tejidos producidos durante la elaboración del jugo (Filippi, Genovese & Lozano, 2008).

El durazno (*Prunus persica* L. Batsch) es originario de China, posteriormente introducido en Persia, y luego distribuido por los romanos por toda Europa, siendo los españoles los responsables de la introducción de muchas variedades en América. Debido a su valiosa composición nutricional, el durazno era considerado por los antiguos chinos como un símbolo de larga vida e inmortalidad (Siddiq, 2006). Una fruta media pesa aproximadamente 75 g y aporta 30 calorías, 7 g de carbohidratos (6 g de azúcares y 1 g de fibra), 1 g de proteína, 50 µg de cobre, 20 µg de zinc y 5 mg de vitamina C (Matei *et al.* 2013). Sin embargo, estos valores varían de acuerdo a la variedad, región de cultivo, estado de madurez y factores climáticos. Esta fruta es además rica en carotenoides (provitamina A), compuestos fenólicos y otros antioxidantes (Tareen, Abbasi & Hafiz, 2012).

En Argentina la producción de durazno destinada a la industria se encuentra principalmente concentrada en la provincia de Mendoza, mientras que las variedades de durazno para consumo en fresco se distribuyen principalmente entre las provincias de Mendoza, Buenos Aires, Córdoba y Río Negro (Denoya, 2015).

Durante los últimos años el consumo de bebidas formuladas con proteínas de soja se ha incrementado gradualmente debido a la alta concentración de compuestos con importantes actividades biológicas, como por ejemplo, las isoflavonas. A partir de estudios clínicos y epidemiológicos se ha sugerido que el consumo de dietas ricas en isoflavonas estaría asociado a una disminución en el riesgo de padecer enfermedades coronarias, osteoporosis, cáncer dependiente de hormonas, obesidad y diabetes (Anderson, Johnstone & Cook-Newell, 1995; Adlercreutz & Mazur, 1997; Peeters, 2003). Si a su vez a estas bebidas se formulan con jugo de vegetales y se les adiciona calcio, se transforman en una excelente fuente de este mineral y compuestos bioactivos como vitamina C, tocoferoles y carotenoides, que proporcionan beneficios a la salud, reduciendo el riesgo de padecer ciertos tipos de enfermedades (cardíacas, cáncer, degeneración de la mácula retiniana) (Prior & Cao, 2000; Michels *et al.* 2000; Kris-Etherton *et al.* 2002; Campbell & Padilla-Zakour, 2013).

## II. Nuevas tecnologías de procesamiento de alimentos

Los atributos más importantes a la hora de elegir un producto alimenticio son las características sensoriales: apariencia, color, textura, *flavor*, aroma. Debido a ello, en las últimas dos décadas, la industria procesadora de alimentos y los sectores de I+D+In se han preocupado por el desarrollo de tecnologías de proceso, que además de asegurar la inocuidad de los alimentos, posibiliten la retención de características sensoriales deseables o reduzcan los cambios indeseables que se producen durante el procesamiento. Los métodos físicos de preservación (esterilización térmica, pasteurización térmica, refrigeración, congelación, deshidratación, envasado) y los químicos (reducción del pH o uso de preservantes) siguen utilizándose masivamente debido a su efectividad en la inactivación de microorganismos patógenos y alteradores y de enzimas vinculadas al deterioro de los alimentos. Los métodos de preservación más utilizados en la actualidad son de naturaleza térmica, en los cuales la temperatura es el principal factor de preservación. Si bien son muy efectivos desde el punto de vista de la inocuidad y la estabilidad de los alimentos, producen modificaciones del sabor natural de los alimentos y destrucción de compuestos de interés nutricional, como las vitaminas. Además, los procesos térmicos convencionales suelen ser de larga duración debido a que se basan en la transferencia de calor cuya fuerza impulsora es el gradiente de temperatura entre el alimento y el medio calefactor y a que los alimentos en general son malos conductores del calor. Esto determina que los tratamientos térmicos resulten largos y con alto consumo de energía. Por este motivo, la búsqueda de procesos innovadores de preservación, tanto de naturaleza térmica (microondas, radiofrecuencia, calentamiento óhmico, etc.) como no térmicos (altas presiones hidrostáticas –APH–, campos eléctricos pulsados, radiaciones ionizantes, pulsos lumínicos, etc.), constituyen alternativas tecnológicas interesantes para asegurar la inocuidad, preservar la calidad nutricional y sensorial y extender la vida útil de los alimentos. En este contexto, las APH constituyen una tecnología madura, adoptada por la industria procesadora de alimentos y aceptada por los consumidores, porque permiten preservar la frescura original, a la vez de asegurar la inocuidad y extenderla la vida útil de los alimentos (McClements, Patterson & Linton, 2001).

### II.I. Tecnología de Altas Presiones Hidrostáticas (APH)

En la búsqueda de nuevas formas de preservación de alimentos y con el objetivo de obtener productos con alta calidad sensorial y nutricional, seguros desde el punto de vista microbiológico, con larga vida útil y con características similares a los productos frescos, la

aplicación de APH ha recibido especial atención alrededor del mundo debido a sus diferentes aplicaciones. Se trata de una tecnología que en los últimos 15 años ha experimentado a nivel internacional una importante adopción por parte de la industria procesadora de alimentos. Surge como una alternativa a los tratamientos térmicos convencionales utilizados en la industria para pasteurizar y extender la vida útil de los productos alimenticios (Palou, Lopez-Malo & Welti-Chanes, 2002). En la preservación de alimentos mediante APH, los microorganismos vegetativos son inactivados sin la aplicación de temperatura, por lo que se la puede considerar como una tecnología de “pasteurización fría” (Crawford *et al.* 1996). De esta manera, el contenido de vitaminas, el aroma, el *flavor* y el color de los alimentos no es afectado o lo es en forma mínima (Swientek, 1992; Palou *et al.* 2000). La tecnología de APH aplicada a alimentos consiste en someter a un alimento envasado en envases flexibles y herméticos, a presiones de entre 100 y 1400 MPa por tiempos cortos (< 10 min) y a temperaturas en el rango de -40 a 110 °C. En la actualidad, esas condiciones operativas solo pueden ser aplicadas en equipos de laboratorio, siendo 600 MPa la mayor presión alcanzada en los equipos a escala industrial. En los equipos industriales los tratamientos se realizan a temperatura ambiente o de refrigeración. A modo informativo y para representar la magnitud de la presión que se puede aplicar en esos equipos, en la Figura In.1. se muestran algunos valores de referencia. Por ejemplo, en el procesamiento de alimentos se utilizan presiones hasta 10 veces superiores (a nivel de laboratorio) o hasta 6 veces superiores (a nivel industrial) a las encontradas en la fosa de las Islas Marianas en el Océano Pacífico, el lugar más profundo de la corteza terrestre (unos 116 MPa a 11 km de profundidad) (Yaldagard, Mortazavi & Tabatabaie, 2008).

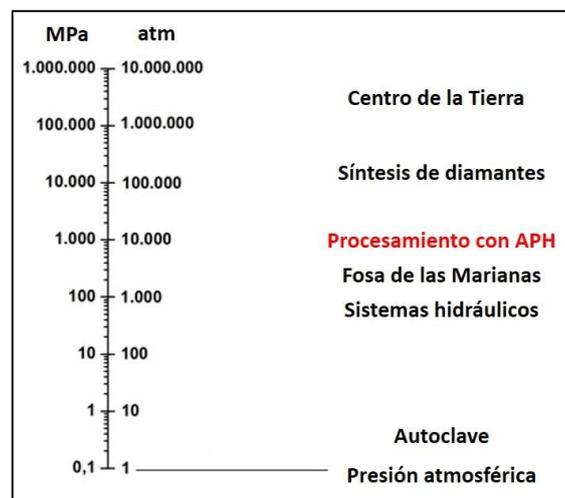


Figura In.1. Niveles de presión alcanzados en diversos procesos y su relación con los utilizados en los tratamientos con APH. Los valores se muestran en dos unidades de presión: megapascales (MPa), atmósferas (atm). Traducido y modificado de <http://www.hiperbaric.com/es/alta-presion>.

En sus comienzos la tecnología de APH se utilizó principalmente en la industria de los materiales: cerámicas, acero, producción de aleaciones, entre otras. El primer registro que se tiene de la aplicación de APH en los alimentos data de la última década del siglo XIX realizado por Bert Hite en 1899 (Hite, 1899). Utilizando un equipo que le permitía alcanzar una presión de 689 MPa trató diferentes alimentos y bebidas, como carne y leche, además de realizar investigaciones sobre la inactivación de ciertos virus. Entre las investigaciones posteriormente realizadas pueden citarse las de Bridgman (1914) sobre la desnaturalización de proteínas de huevo, Timson y Short (1965) sobre el efecto de las APH en microorganismos en leche cruda, Wilson (1974) sobre la preservación de alimentos de baja acidez y Elgasim y Kennick (1980) sobre el efecto de la tecnología en la calidad de carnes. En 1990, la empresa Meidi-ya Food Co. (Osaka, Japón) introdujo en el mercado jaleas de kiwi, frutilla y manzana preservadas mediante la aplicación de APH (Mozhaev *et al.* 1994; Palou *et al.* 2000). Hayashi (1995) presentó una lista de alimentos procesados con APH comercializados en el mercado japonés: postres y aderezos a base de fruta, jugos de mandarina y uva, calamar crudo y salchichas de pescado. La aplicación de APH representa la tecnología emergente no térmica más difundida en comparación con otras tecnologías contemporáneas (campos eléctricos pulsados de alta intensidad, pulsos lumínicos, tratamientos con radiación UV-C, entre otras). En los países desarrollados, se comercializan diferentes productos pasteurizados mediante esta tecnología como, por ejemplo: productos cárnicos en rodajas (Espuña, España), palta y guacamole (Fresherized Foods <sup>TM</sup>, EEUU; Avomix, España), alimentos listos para el consumo como salsas, sopas, cremas, ensaladas, entradas, tapas, rellenos (Espuña, España; Sandridge® Food Corporation, EEUU; Maple Leaf, Canadá), productos del mar como ostras, langostas, mejillones, bogavantes (las APH mejoran la extracción de la carne disminuyendo los costos de producción) (Mitsunori, Japón), jugos y purés de frutas y hortalizas (Preshafood Ltd., Australia; UGO, República Checa, Ulti, Francia; Villa de Patos, México; Coldpress, Reino Unido), productos basados en calostro (Fonterra, Nueva Zelanda), presas y productos de pollo cocido (Tyson Foods y Foster Farms, EEUU), arroz y cereales modificados (a través de cambios en la estructura de proteínas y almidones, aumento de reacciones enzimáticas, cambios en la permeabilidad al agua y a los gases) (Echigo Seika, Japón), entre otros.

Hasta el año 2014, alrededor de 260 equipos industriales de APH se encontraban en funcionamiento para el procesamiento de alimentos en todo el mundo (Figura In.2.). Aproximadamente el 85 % de esos equipos fueron instalados después del año 2000, aun cuando los primeros productos comerciales fueron lanzados al mercado en 1990. Ello se

debería a lo novedoso del proceso en sus inicios y a falta de conocimiento de los beneficios de la tecnología. Actualmente, alrededor del 57 % de los equipos de APH se encuentran en América, distribuidos principalmente en EEUU, México y Canadá, con algunas unidades en Perú, Chile y Brasil (Figura In.2.). Europa tiene el 26 % de los equipos con unidades en España, Italia, Portugal, Francia, Reino Unido, República Checa, Alemania, Bélgica, Holanda, Grecia, Polonia y Austria. El 13 % se encuentra en Asia, especialmente en Japón, Corea y China. A su vez, algunos equipos se encuentran localizados en Australia y Nueva Zelanda, y recientemente en Sudáfrica (Figura In.2.). La tecnología APH parece avanzar principalmente en países donde los consumidores pretenden productos *premium* y listo para consumir (Tonello, 2014).

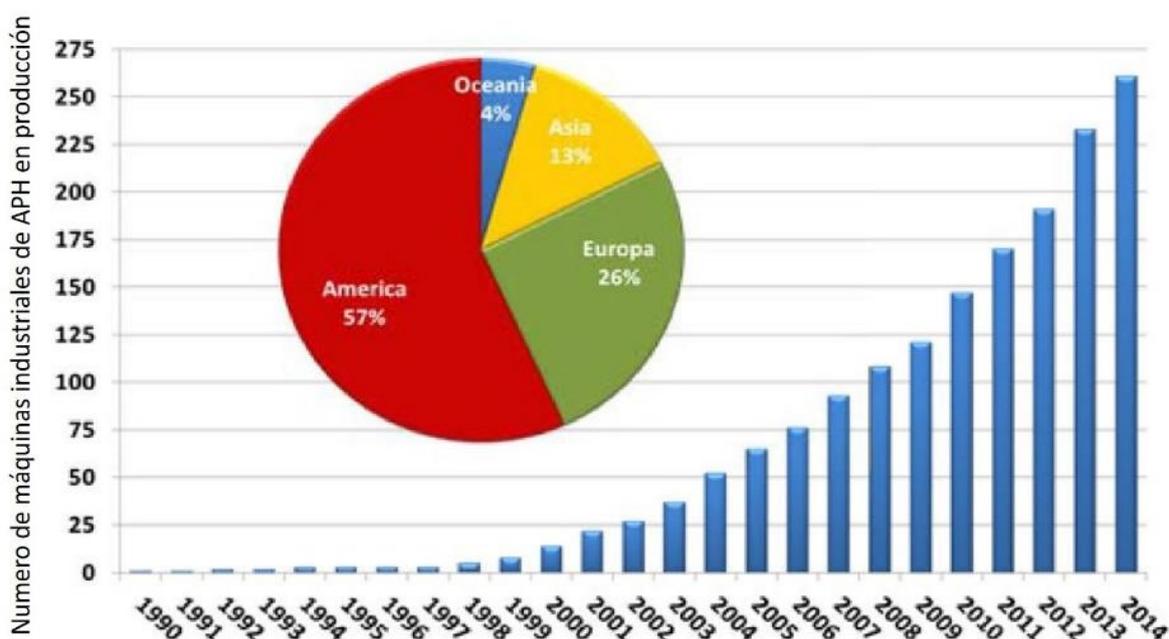
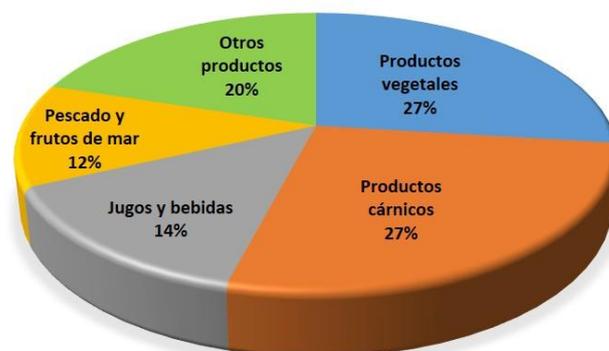


Figura In.2. Crecimiento del parque mundial de equipos industriales de APH aplicados en el procesamiento de alimentos y distribución de equipos APH en los diferentes continentes (Tonello, 2014).

Aproximadamente un tercio de los equipos industriales de APH se utilizan para el procesamiento de vegetales, observándose la mayor aplicación en los productos derivados de la palta (como el guacamole) (Figura In.3.). El segundo tercio lo ocupan los productos cárnicos, como jamones cocidos o curados en rodajas, salchichas, hamburguesas y productos derivados de pollo y pavo. El requerimiento de ausencia de *Listeria monocytogenes* impuesto por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (sigla en inglés USDA) para los productos cárnicos “listos para consumir” fue una de las razones por la

cual diferentes empresas correspondientes al sector de productos cárnicos eligieron incorporar la tecnología APH a su línea productiva (Garriga *et al.* 2004). El último tercio lo ocupan productos de mar, jugos y bebidas, y otros productos como los lácteos (Figura In.3.).



**Figura In.3. Distribución de productos tratados con APH por tipo de alimento (Tonello, 2014).**

Actualmente los volúmenes de producción aún son pequeños y el costo de inversión es elevado. Sin embargo, la tecnología APH presenta grandes ventajas, como por ejemplo un menor consumo energético en relación a tecnologías convencionales como los procesos térmicos. De esta manera, los productos tratados con APH resultan competitivos a nivel comercial (Tonello, 2011). Dependiendo de los parámetros operativos aplicados y de la escala de producción (tamaño del equipo), los costos de aplicación de esta tecnología son de U\$S 0,08-0,50 por kilo de producto, incluyendo la amortización del equipo y los costos operativos. Con el incremento de la demanda de los productos tratados con APH y las innovaciones en el diseño de equipamientos, se esperan reducciones tanto en la inversión inicial como en los costos operativos (Terefe, Buckow & Versteeg, 2014).

## II.II. Principios involucrados en el procesamiento con APH

El procesamiento con APH se basa en tres principios generales: el principio isostático, el de ordenamiento microscópico y el de Le Chatelier.

El principio isostático establece que cuando una muestra se encuentra sometida a presión la misma es transmitida de manera uniforme y cuasi-instantánea siempre que la muestra se encuentre en contacto directo con el fluido de transmisión de la presión o contenida en forma hermética dentro de un envase flexible sumergido en el mismo (Olsson, 1995). Por lo tanto y contrariamente a lo que sucede con los tratamientos térmicos, los tiempos de

tratamiento son cortos e independientes de las dimensiones y forma de la muestra (Tao *et al.* 2014).

El principio de ordenamiento microscópico implica que, a temperatura constante, un incremento en la presión incrementará el grado de ordenamiento de las moléculas de una sustancia dada (Tewari, 2008). Si un producto alimenticio contiene suficiente humedad, la presión no lo dañará a nivel macroscópico, siempre y cuando la presión se aplique de manera uniforme en todas las direcciones. Esto puede describirse con el siguiente ejemplo: una uva se puede aplastar fácilmente al presionarla entre los dedos y ejerciendo presión a lo largo de un eje. En cambio, si la uva está expuesta a una presión uniforme sumergiéndola en agua en el interior una botella sellada flexible, esta mantiene su forma independientemente de lo fuerte que la botella se apriete. En este caso, la presión transmitida desde la pared de la botella a través del agua se aplica uniformemente alrededor de la fruta. De manera similar, la presión no produce daño en la mayoría de los alimentos procesados por alta presión, siempre y cuando el alimento no tenga una estructura porosa. Las burbujas de aire colapsan por efecto de la presión debido a las diferencias entre la compresibilidad del aire y el agua, y a menos que el alimento sea perfectamente elástico y contenga al aire, este no recuperará su tamaño y forma originales (Balasubramaniam *et al.* 2004).

De acuerdo al principio de Le Chatelier cuando se perturba un sistema en equilibrio el mismo responde en el sentido que tiende a minimizar la perturbación. De esta manera, cualquier sistema biológico o químico al que se aplique presión sufrirá una reducción de su volumen, y el equilibrio de la reacción se desplazará hacia el estado de mayor compactación. Según los principios que rigen el equilibrio químico, cualquier cambio en una reacción química involucra un cambio en la energía libre de Gibbs. Este cambio es función de la presión (P) y de la temperatura (T) y gobernado por los cambios en el volumen ( $\Delta V$ ) y en la entropía ( $\Delta S$ ). Si se asume que durante el tratamiento con APH la temperatura permanece constante, entonces la dependencia de la energía libre de Gibbs con la presión queda determinada por la variación en el volumen ( $\Delta V$ ) (ecuación de van 't Hoff, (1)). La constante de equilibrio (K) de la reacción se define por la ley de acción de masas, en donde  $\Delta V$  es la diferencia de volúmenes entre productos y reactivos. De esta manera, si una reacción es promovida por APH el valor de K se incrementará y el  $\Delta V$  se volverá negativo indicando que el estado final ocupará menos volumen que el inicial.

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial P}\right)_T = -\left(\frac{\Delta V}{RT}\right) \quad (1)$$

En sistemas que no se encuentran en equilibrio la dependencia de la constante de velocidad de reacción ( $k$ ) viene dada por la ecuación (1), pero en lugar del  $\Delta V$  se utiliza el volumen de activación ( $\Delta V^\ddagger$ ) según la ecuación (2). La constante de velocidad de reacción se incrementa o disminuye dependiendo del comportamiento de  $\Delta V^\ddagger$  (diferencia entre los volúmenes del estado de transición y el estado inicial). El valor de  $\Delta V^\ddagger$  es un parámetro útil para comparar  $k$  de diferentes reacciones bajo condiciones de alta presión (Bolumar *et al.* 2012). Cuanto más negativo sea el valor de  $\Delta V^\ddagger$  más favorecida estará la reacción (Knorr, Heinz & Buckow, 2006). Tanto en la ecuación (1) como la (2)  $R$  es la constante general de los gases y  $T$  la temperatura absoluta.

$$\left(\frac{\partial \ln k}{\partial P}\right)_T = -\left(\frac{\Delta V^\ddagger}{RT}\right) \quad (2)$$

Aunque los alimentos no son sistemas en equilibrio, esto explicaría por qué las APH estimulan algunos procesos (por ejemplo, transiciones de fase, cambios en la configuración molecular, reacciones químicas) que son acompañados por reducción de volumen y, por otra parte, inhiben reacciones que involucren un incremento de volumen (Norton & Sun, 2008). A temperaturas relativamente bajas (0 - 40°C), las uniones covalentes (que tienen baja compresibilidad) no son afectadas por las APH, mientras que las interacciones iónicas e hidrofóbicas, que mantienen las estructuras terciarias y cuaternarias de moléculas, resultarían alteradas, sobre todo a presiones mayores a 200 MPa (Yaldagard, Mortazavi & Tabatabaie, 2008; Heinz & Buckow, 2010). En la práctica, esto se traduce en que los componentes de bajo peso molecular presentes en los alimentos (principalmente aquellos que influyen sobre la calidad nutricional y sensorial, tales como vitaminas, antioxidantes, pigmentos o compuestos asociados con el aroma), permanecerán inalterados luego del tratamiento, mientras que componentes de alto peso molecular (aquellos cuya estructura terciaria o cuaternaria es importante para su funcionalidad), podrían efectivamente ser alterados en distinta medida. Las reacciones que son fuertemente afectadas por las APH incluyen generalmente a reactivos y productos que difieren en el número de grupos capaces de ionizarse. En sistemas acuosos, la exposición de grupos cargados hacia el solvente

favorece la disminución del volumen del sistema debido al fenómeno de electroconstricción de moléculas de agua alrededor de los iones. La electroconstricción es la contracción de moléculas de solventes polares, como agua o alcoholes, debido a la alineación de las mismas alrededor del campo eléctrico generado por la carga expuesta (Boonyaratanakornkit, Park & Clark, 2002). De esta manera, la aplicación de APH favorecería la disociación de las interacciones electrostáticas (Hoover *et al.* 1989; Chalikian, Sarvazyan & Breslauer, 1993). En el caso de las interacciones por puente hidrógeno, debido a que su formación involucra la disminución del volumen, la misma se verá favorecida por la aplicación de presión. Si bien se ha demostrado que las APH producen la desnaturalización proteica, la magnitud de la misma a presiones moderadas (<100 MPa) se ve reducida debido al establecimiento de interacciones puente hidrógeno, involucrados en el mantenimiento de las estructuras secundarias de los péptidos. En el caso de las interacciones hidrofóbicas se ha comprobado que las mismas están también influenciadas por la presión. Sin embargo, existe una fuerte controversia sobre el efecto de las APH sobre las interacciones hidrofóbicas. Mientras algunos autores proponen un debilitamiento de las mismas con el aumento de la presión debido a una variación negativa del volumen del sistema cuando un grupo apolar es transferido desde el interior de la proteína hacia el medio circundante (Kauzmann, 1987; Hummer *et al.* 1998; Frye & Royer, 1998), otros sostienen que la formación de clatratos (red formada por moléculas de solvente) alrededor de un residuo hidrofóbico expuesto luego del tratamiento con APH generaría un  $\Delta V$  positivo, reforzando las interacciones hidrofóbicas, en lugar de debilitarlas, con el aumento de presión (Hei & Clark, 1994; Michels, Hei & Clark, 1996; Boonyaratanakornkit, Park & Clark, 2002). En la práctica, las interacciones hidrofóbicas son estabilizadas por la aplicación de presiones moderadas, pero debilitadas a altas presiones (Royer, 2002). Por su parte, Smolin y Winter (2006) y Sarupria y Garde (2009) encontraron que las moléculas de agua en la cercanía de grupos no polares presentaban mayor compresibilidad que las que se encontraban en el seno de la dispersión o formando parte de la capa de hidratación hidrofílica. Adicionalmente, Grigera y McCarthy (2010) concluyeron que la principal fuerza impulsora que produce la desnaturalización proteica es la disminución de las interacciones hidrofóbicas a altas presiones como consecuencia de cambios en la estructura del agua, desde una estructura tetraédrica abierta a una hexagonal compacta. De esta manera, la exposición de *patches* hidrofóbicos en una proteína globular por la aplicación de altos niveles de presión produciría una disminución en el volumen del sistema, favoreciendo el proceso de desplegamiento y desnaturalización.

### II.III. Descripción del proceso y de los equipos

La presión puede ser aplicada por compresión directa o indirecta (Mertens, 1995). En el caso de la compresión directa, la presión hidráulica es aplicada por un pistón que acciona sobre el fluido. En el caso de alimentos, el fluido sería el mismo producto, y a nivel industrial este sistema se aplica exclusivamente a jugos (Figura In.4.). Este sistema es menos aplicado que el de compresión indirecta, debido a la mayor complejidad de construcción de los equipos, inconvenientes con el sello pistón-cilindro, problemas de contaminación del alimento con lubricantes o partículas de material. En el caso de los sistemas de compresión indirecta, la presión se aplica al alimento envasado y es transmitida por un fluido (agua en los equipos industriales o mezclas de alcoholes y agua o aceite de siliconas, entre otros, en los equipos de escala piloto o laboratorio) que es presurizado mediante un sistema de bombas de alta presión y/o intensificadores (Figura In.4.). Los intensificadores permiten alcanzar altos niveles de presión mediante un sistema de pistones de áreas muy diferentes (Figura In.5.). Así, en este dispositivo, se introduce aceite a una presión de 20 MPa del lado de alta presión del pistón principal, que tiene una relación de áreas de 30:1 con respecto al otro pistón, el cual finalmente impulsará al fluido de presurización hacia la cámara de presurización. Al alcanzar el pistón principal el final de su desplazamiento, el sistema se revierte y en el otro lado del pistón principal se introduce aceite a alta presión, mientras que por el otro lado el fluido de presurización se libera (Torres & Velázquez, 2005). Una vez alcanzada la presión de operación, se cierran las válvulas y el sistema la mantiene sin gasto de energía adicional (Farr, 1990).

Un equipo típico de APH (sistema de compresión indirecta) consiste en una cámara de presurización, canastos para la carga de los alimentos envasados, un sistema de generación de alta presión y un sistema para monitoreo y control de la presión y de la temperatura. La cámara de presurización de los equipos APH siempre es de forma cilíndrica, para asegurar una distribución homogénea de la presión sobre las paredes de la cámara. Un ciclo típico de operación de equipo APH de compresión indirecta (Figura In.6.) comienza con la carga del alimento envasado en canastos, generalmente de material plástico o aluminio, con abertura superior y orificios laterales, luego los canastos se incorporan a la cámara de presurización del equipo, posteriormente se realiza el ingreso del fluido de compresión y el aumento de la presión hasta la condición de operación y luego se realiza el cierre del sistema (Welti-Chanes *et al.* 2005). Luego se mantiene la presión durante el tiempo estipulado (tiempo de mantenimiento o *holding time*) y posteriormente la cámara se descomprime mediante la

liberación del fluido de transmisión de la presión y finalmente se realiza la descarga de los canastos y del producto.

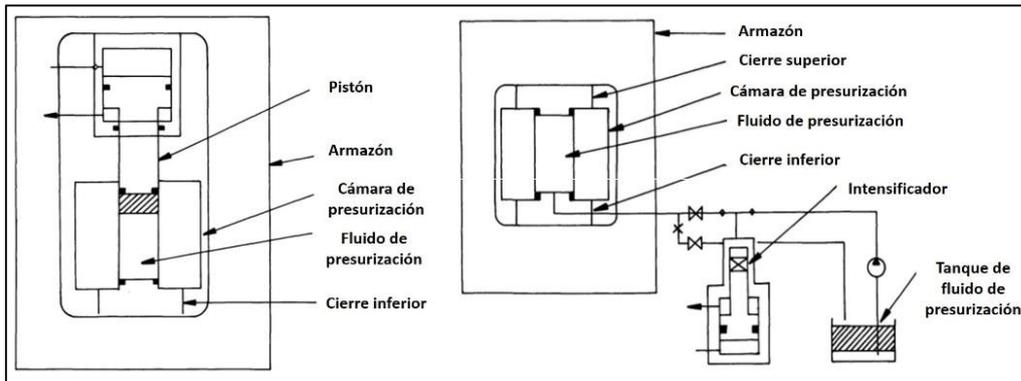


Figura In.4. Sistemas de compresión directa e indirecta. Traducido de Mertens (1995).

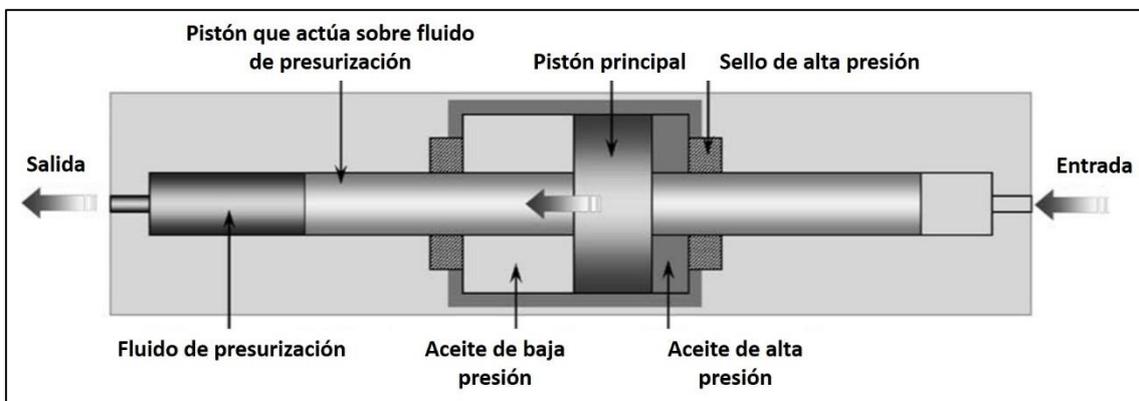


Figura In.5. Esquema de funcionamiento de un intensificador de presión, componente de los equipos de APH de compresión indirecta. Traducido de Torres y Velázquez (2005).

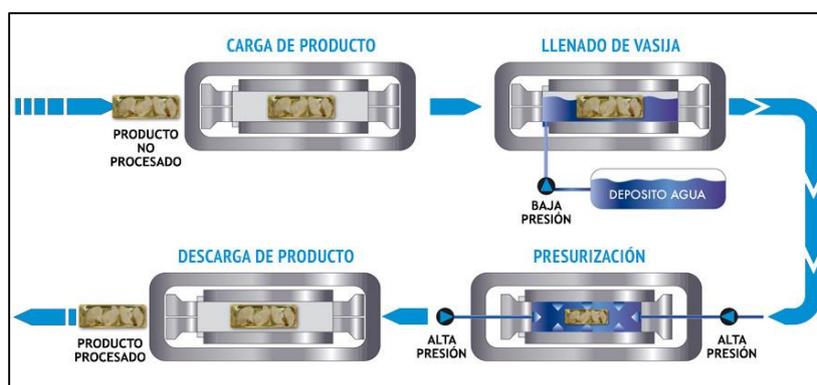


Figura In.6. Esquema de un ciclo típico de operación de un sistema APH de compresión indirecta (discontinuo). Obtenido de <http://www.hiperbaric.com/es/alta-presion>.

El sistema de APH utilizado en este Trabajo de Tesis Doctoral fue un equipo Stansted Fluid Power Ltd. High Pressure Iso-Lab System, modelo FPG9400:922 (Stansted, Reino Unido) de escala piloto, sistema de compresión indirecta que dispone de cuatro módulos (Figura In.7). El mismo se encuentra ubicado en la planta piloto del Instituto Tecnología de Alimentos de INTA Castelar.



**Figura In.7. Sistema de APH Stansted Fluid Power Ltd. High Pressure Iso-Lab System modelo FPG9400:922 utilizado en el presente Trabajo de Tesis Doctoral.**

Cada uno de los módulos se describe a continuación:

- **Módulo de control**

El módulo de control consta de una computadora que dispone de un controlador lógico programable con *software* SCADA para el control automático del equipo (Figura In.8.). En la interfase del sistema SCADA se ingresan las condiciones de operación (velocidad de compresión, presión de trabajo, tiempo de mantenimiento a la presión de trabajo) y datos de la muestra. El sistema también controla la operación de los módulos de refrigeración y de calefacción, permitiendo acondicionar la temperatura del cilindro (dispone de una camisa de intercambio de calor) y la temperatura del fluido de presurización al ingresar al cilindro (dispone de un intercambiador de doble tubo). El sistema SCADA también controla el funcionamiento de cada parte del equipo, la apertura y cierre de válvulas, monitorea las principales variables del proceso y las almacena en el disco rígido de la computadora. El procesamiento posterior de esos datos permite obtener gráficos presión-tiempo y temperatura-tiempo.



Figura In.8. Imagen correspondiente al módulo de control del equipo APH Stansted Fluid Power Ltd.

- **Módulo prensa**

El módulo prensa dispone de un cilindro de alta presión encamisado en el cual ingresa el fluido de transmisión de la presión por la parte inferior del mismo (Figura In.9.). En el caso del equipo APH utilizado en este trabajo, los fluidos de presurización utilizados fueron mezclas de alcohol propilenglicol y agua destilada, en diferentes proporciones según la temperatura de trabajo. En el interior del cilindro se coloca el canasto de aluminio de paredes perforadas donde se introduce el alimento envasado (Figura In.10.). La presión máxima de operación del equipo es de 900 MPa y el cilindro posee una capacidad de 2 L.



Figura In.9. Cilindro de alta presión encamisado del equipo APH Stansted Fluid Power Ltd.



Figura In.10. Canasto de aluminio para carga del alimento envasado en el equipo APH Stansted Fluid Power Ltd.

- **Módulo de servicio**

Contiene las distintas bombas de precarga y elevación de la presión, los intensificadores de presión, las válvulas de descompresión y el tanque (*calorifier*) que contiene el fluido de acondicionamiento térmico (Figura In.11.).



Figura In.11. Módulo de servicio del equipo APH Stansted Fluid Power Ltd.

- **Módulo de refrigeración y sistema de calefacción**

En los equipos de escala laboratorio y piloto, la temperatura del interior de la cámara de presurización puede ser acondicionada desde el exterior (control externo de temperatura) o mediante una fuente o sumidero de calor ubicado dentro de la cámara de presurización (control interno de temperatura) (Mertens, 1995). En el equipo de APH utilizado en el presente trabajo, el acondicionamiento térmico se realiza haciendo circular un fluido en la camisa de intercambio de calor que rodea al cilindro de alta presión. A su vez, es posible acondicionar el fluido de transmisión de la presión a la temperatura deseada, haciéndolo circular por un intercambiador de calor de doble tubo. El fluido de acondicionamiento térmico que utiliza el sistema es una mezcla de agua destilada y propilenglicol, en proporciones variables según la temperatura que se requiera. El fluido de acondicionamiento térmico circula en reciclo entre el tanque de depósito (*calorifier*) y la camisa de intercambio de calor y el intercambiador de calor de doble tubo. Ese fluido es calefaccionado en el tanque de depósito mediante una resistencia eléctrica cuando se requiere trabajar con temperaturas moderadas o altas. A su vez, cuando se requiere trabajar a temperaturas de refrigeración o subcero, el fluido es enfriado en el tanque a través de un serpentín por el cual circula en reciclo una mezcla de etilenglicol y agua, la cual es enfriada en un sistema de refrigeración mecánico (*chiller*; Figura In.12.).



Figura In.12. Imagen correspondiente al módulo de refrigeración marca Euro Chiller, acoplado al equipo APH.

#### II.IV. Principales parámetros del proceso

- **Tiempo de compresión o *come-up time* (CUT)**

Es el tiempo requerido ( $t_s$ , Figura In.13.) para incrementar la presión del sistema desde la presión atmosférica ( $P_s$ , Figura In.13.) hasta la presión del proceso ( $P_1$ - $P_2$ , Figura In.13). El CUT depende del fluido de compresión, de la potencia del sistema de generación de alta presión (bomba, intensificadores), que condicionan la velocidad de compresión y de la presión de proceso. En equipos de laboratorio es posible modificar la velocidad de compresión, mientras que en equipos industriales este parámetro es definido por el fabricante del equipo y en general no es posible modificarlo.

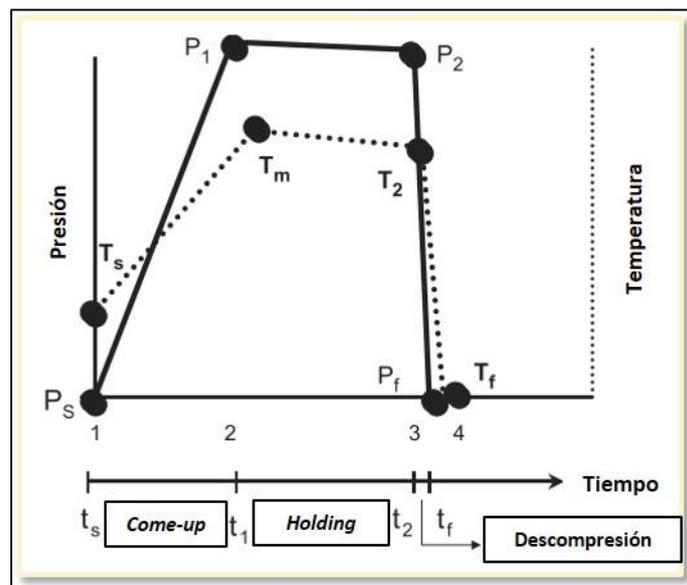


Figura In.13. Principales parámetros del proceso (presión, temperatura y tiempo de mantenimiento) (Balasubramanian *et al.* 2004)

- **Tiempo de mantenimiento (*holding time*)**

El tiempo de mantenimiento ( $t_{1-t_2}$ , Figura In.13.) de la presión del proceso es el intervalo comprendido entre el fin de la compresión y el principio de la descompresión. Para una aplicación industrial factible, deben utilizarse tiempos de mantenimiento cortos, debido a que el tiempo de procesamiento tiene un efecto significativo en el costo del producto. En la aplicación de APH en la preservación de alimentos, en general se observa que un aumento del tiempo de mantenimiento incrementa la tasa de inactivación de los microorganismos. La selección del tiempo de mantenimiento surge de un análisis que involucra los factores intrínsecos del alimento (pH, composición, actividad de agua, etc.) y extrínsecos (nivel de presión, temperatura, velocidad de compresión, capacidad del cilindro del equipo disponible, tipo de envase, relación de llenado del cilindro, etc.). Se debe evaluar la posibilidad de trabajar a la máxima presión posible para reducir el tiempo de mantenimiento.

- **Tiempo de descompresión**

Comprende el tiempo ( $t_f$ , Figura In.13.) necesario para llevar la presión del sistema desde la presión del proceso a la presión atmosférica ( $P_f$ , Figura In.13.). En general la descompresión se realiza en más de una etapa para evitar que se afecte la estructura de los alimentos. En general, la velocidad de descompresión no se puede modificar, se trabaja con las condiciones definidas por el fabricante del equipo.

- **Tiempo de ciclo o tiempo total de procesamiento**

Comprende el tiempo total para la carga, cierre del equipo, compresión, mantenimiento, descompresión y descarga. El tiempo de ciclo y la eficiencia volumétrica (porcentaje ocupado del volumen de la cámara por el producto) afectan directamente en el costo del tratamiento APH. En general, los tiempos totales de procesamiento no superan los 10 min.

- **Presión del proceso**

La presión de proceso es la que se aplica durante el tratamiento ( $P_1-P_2$ , Figura In.13.). La precisión de la lectura de la presión debe ser indicada junto al valor medido. Se recomienda realizar calibraciones periódicas de los instrumentos de medición. El nivel de presión es un factor muy importante ya que se observó que a presiones superiores a 200 – 300 MPa, el incremento de la presión produce un aumento de las reducciones decimales de los

recuentos de las células vegetativas. También se informó que el nivel de presión tiene efecto sobre la estructura de las macromoléculas y las transiciones de fase.

- **Temperatura inicial del producto y variación de temperatura durante el tratamiento con APH**

La temperatura inicial del producto y del líquido de compresión ( $T_s$ , Figura In.13.) debe registrarse antes de iniciar el proceso ya que cuando se comprime un fluido la temperatura del mismo aumentará debido al calentamiento generado por la compresión ( $T_m$ , Figuras In.13. e In.14.). A su vez, la temperatura puede disminuir o mantenerse constante durante la fase de mantenimiento de la presión de proceso. En el caso que el cilindro de alta presión disponga de una camisa de intercambio de calor o presente aislamiento térmico, la temperatura puede mantenerse constante durante la fase de mantenimiento. El incremento de la temperatura en algunos casos es favorable y puede ser utilizado tecnológicamente, porque se trata de un calentamiento rápido. Según se observa en las Figuras In.13. e In.14., la curva temperatura-tiempo es similar a las curvas en los tratamientos térmicos UHT y puede aplicarse para incrementar la inactivación microbiana y lograr un efecto combinado, como en el caso de pasteurización y esterilización asistidas con APH. Durante la descompresión la temperatura disminuye como consecuencia del enfriamiento adiabático.

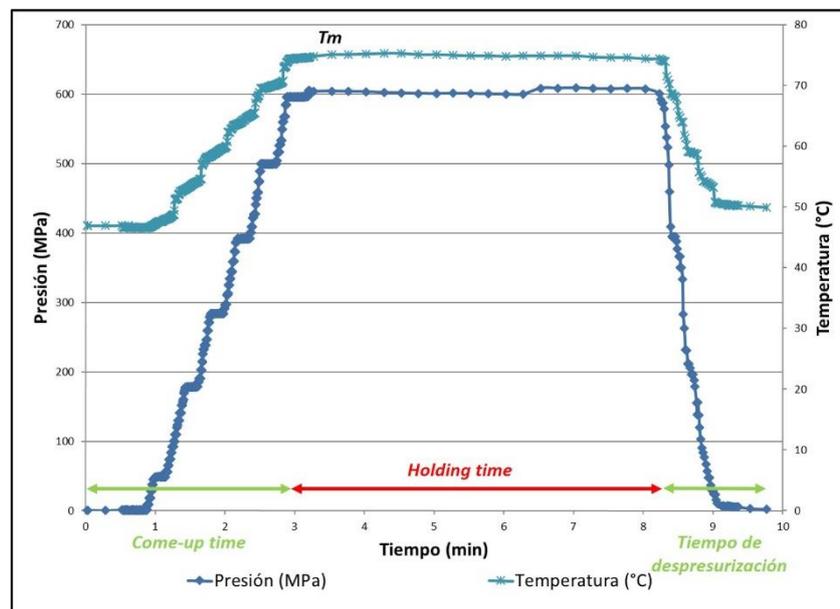


Figura In.14. Evolución de la temperatura y el nivel de presión correspondiente a un tratamiento con APH a 600 MPa durante 5 min a partir de una temperatura inicial de 45 °C.  $T_m$  representa la temperatura máxima alcanzada a la presión de proceso. Los datos provienen de uno de los ensayos realizados en el presente trabajo.

Para el caso del agua, cada incremento de 100 MPa en la presión produce un aumento de 2 – 3 °C en la temperatura. Este aumento de la temperatura es el resultado de la fricción interna generada cuando un fluido es comprimido adiabáticamente a presiones extremas (Bolumar, Georget & Mathys, 2015). Para el caso de los alimentos el incremento de la temperatura depende de su composición (fundamentalmente agua y contenido lipídico que afectan la capacidad calorífica del alimento), de la temperatura inicial, del nivel de presión y de la velocidad de compresión (Otero *et al.* 2007). En alimentos con alta humedad podrían utilizarse las propiedades termodinámicas del agua para calcular el incremento de temperatura debido a la compresión. Sin embargo, en alimentos con alto contenido lipídico el incremento de temperatura es mayor, aproximadamente 9 °C por cada 100 MPa (Rasanayagam *et al.* 2003). En la Tabla In.1. se presentan valores de incrementos de temperatura observados en diferentes alimentos y componentes debido a la compresión.

**Tabla In.1. Incremento de temperatura en distintos alimentos y componentes debido al calentamiento por compresión. Traducido de Balasubramaniam *et al.* (2004)**

Alimento	Incremento de temperatura (°C) cada 100 MPa
Jugo de naranja, salsa de tomate, leche descremada, salmón	2,6 – 3,0
Carbohidratos	2,6 – 3,6
Proteínas	2,7 – 3,3
Mayonesa	5,0 – 7,2
Grasa vacuna	6,2 – 8,3
Aceite de soja	6,2 – 9,1
Aceite de oliva	6,3 – 8,7

De lo expuesto puede observarse que en un tratamiento con APH la temperatura y la presión son dos variables interrelacionadas, y ambas tienen efecto sobre la estructura de macromoléculas. En consecuencia, deberán ser tenidas en cuenta en forma simultánea al optimizar un tratamiento sobre un determinado alimento.

#### II.V. Requisitos del envase

En los tratamientos con APH aplicados mediante el sistema de compresión indirecta, el producto debe tratarse envasado en su envase final. De esta manera, alimento y envase constituyen una “unidad segura” hasta la apertura del mismo por parte del consumidor (Koutchma, 2014). El procesamiento con APH requiere que los envases sean herméticos y flexibles, de manera de poder soportar los cambios de volumen asociados a la compresibilidad de los alimentos durante la etapa de presurización, así como su expansión

durante la descompresión, sin perder la integridad y/o las propiedades de barrera (Hugas, Garriga & Monfort, 2002). A su vez son de suma importancia la seguridad del material, la posible formación de compuestos que afecten el aroma y el sabor de los alimentos envasados en su interior y el efecto que puedan tener las APH en las propiedades mecánicas y físicas del material del envase (Hogan, Kelly & Sun, 2005). Los materiales que mejor se adaptan a los requerimientos son los poliméricos, entre los que se incluyen al tereftalato de polietileno (más conocido por sus siglas en inglés PET), polietileno, polipropileno, copolímeros de etilen-vinil alcohol y sus combinaciones. Para mejorar las propiedades de barrera de los films poliméricos, los mismos deberán ser cubiertos por capas extremadamente finas (de unos pocos nanómetros) de compuestos inorgánicos tales como óxido de aluminio, o metalizados por deposición de una fina capa de aluminio. Resulta importante considerar también el desarrollo específico de materiales que sean impermeables al oxígeno y opacos a la luz, a fin de garantizar la preservación del color y del *flavor* de los alimentos tratados con APH (Hayashi, 1995).

El tamaño y la forma del envase también son críticos para maximizar la cantidad de producto que se puede cargar en la cámara de presurización en cada ciclo. De esta manera, al alcanzar grandes relaciones de empaquetamiento dentro del cilindro de alta presión del equipo, el proceso resultará más efectivo en término de costos (Hogan, Kelly & Sun, 2005).

## II.VI. Efecto de las APH sobre reacciones químicas y componentes de los alimentos

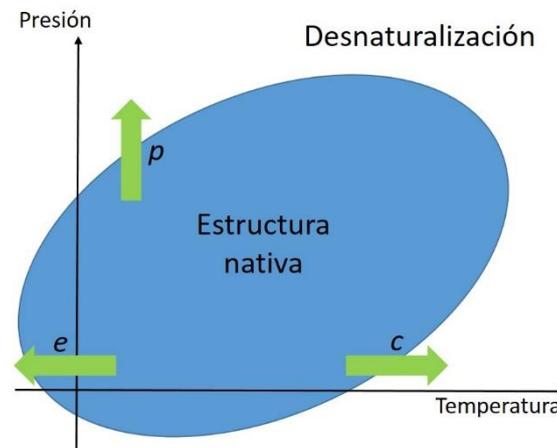
Generalmente la aplicación de APH provoca una disminución en el pH del medio (Hoover *et al.* 1989) ya que afecta el equilibrio de ionización de ácidos y bases débiles (Kitamura & Itoh, 1987; Samaranayake & Sastry, 2010; Min, Samaranayake & Sastry, 2011). El incremento de la presión produce un aumento en el grado de disociación de estos compuestos debido a que los productos de la reacción provocan una disminución del volumen del sistema debido a la electroconstricción de las moléculas de solvente alrededor de las cargas generadas (Hamann, 1980; Min, Samaranayake & Sastry, 2011). La dependencia de los cambios de pH con la presión se encuentra determinada por la composición y las propiedades físico-químicas de la muestra y por sus respectivos cambios durante el tratamiento con APH (Samaranayake & Sastry, 2013). Por su parte Ono, Katho y Mothizuki (1993) encontraron que la adición de calcio a leche de soja produjo la disminución del pH, siendo la magnitud del efecto mayor con el incremento de la concentración del calcio. Los autores asociaron este descenso al desplazamiento de los iones  $H^+$  producido por los iones  $Ca^{+2}$  en los restos asparagil, glutamil e histidil en estado

no-iónico. El pH del sistema es un factor de suma importancia ya que determinará la fracción de los restos aminoacídicos que se encuentren protonados, en función del pKa de los grupos involucrados. Por su parte Kroll (1984) determinó que, a un determinado valor de pH, la cantidad de iones  $H^+$  disociados en presencia de iones  $Ca^{+2}$  fue mayor que en su ausencia. Esto pone de manifiesto la competencia existente entre ambos iones por los mismos sitios de unión, con una mayor afinidad por los iones calcio. A su vez, la constante de afinidad de los iones  $Ca^{+2}$  por los sitios de unión se incrementó con el aumento de los valores de pH (Kroll, 1984).

El tratamiento con APH preserva los perfiles sensoriales y las propiedades nutricionales de los alimentos al tener un mínimo efecto sobre moléculas de bajo peso molecular como vitaminas, compuestos antioxidantes, compuestos volátiles y pigmentos (Carbonell-Capella *et al.* 2013). Biopolímeros como las proteínas, que presentan un ordenamiento definido en el espacio, estabilizado por interacciones hidrofóbicas, puente hidrógeno y electrostáticas son susceptibles a la aplicación de APH. La presión es capaz de afectar principalmente las estructuras terciaria y cuaternaria, pudiendo también modificar la secundaria, de una proteína produciendo su desnaturalización (Balny & Masson, 1993; Balny *et al.* 2002) debido a su efecto disruptivo de las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, con mínimo impacto en los enlaces covalentes (Boonyaratanakornkit, Park & Clark, 2002). El rango de presión en el cual se produce la desnaturalización proteica depende de las características estructurales: presiones tan altas como 1000 MPa pueden no afectar la estructura secundaria de algunas proteínas monoméricas. Por su parte, proteínas oligoméricas pueden disociarse fácilmente a presiones menores a 300 MPa (Boonyaratanakornkit, Park & Clark, 2002). La desnaturalización proteica inducida por las APH se inicia cuando las moléculas de solvente, normalmente agua, son forzadas a ingresar en el interior de la matriz proteica. La pérdida de contacto entre dominios no polares causa el desplegamiento de parte de la molécula, produciendo transiciones conformacionales y su posterior desnaturalización (Knorr, Heinz & Buckow, 2006). De esta manera, la presencia de agua como solvente es un pre-requisito importante para que se verifique el efecto de las APH sobre la estructura proteica (Heremans *et al.* 2000). Estos cambios pueden ser reversibles entre los 100 y 300 MPa e irreversibles a presiones superiores a los 300 MPa, sin perder de vista que el grado de desnaturalización depende, además, del tipo de proteína, de las condiciones de proceso y de la composición del medio (Rastogi *et al.* 2007; Añón, de Lamballerie & Speroni, 2011). Por otra parte, la disminución del grado de movilidad del agua, como ocurre en tratamientos realizados por debajo de 0 °C, favorecería la

reversibilidad de los efectos, como fue descrito por Vaudagna *et al.* (2012) en matrices cárnicas.

Los primeros estudios sobre la relación existente entre la temperatura y las APH y su efecto en las proteínas fueron realizados por Hawley (1971) quien describió un efecto antagónico en ciertos valores de estas variables, esquematizado en un diagrama de fases para la desnaturalización proteica (Figura In.15.). En este diagrama simplificado se pueden observar comportamientos particulares, como ejemplos, a bajas temperaturas la presión a la cual una proteína se desnatura puede ser menor que a altas temperaturas, mientras que a bajas presiones la temperatura necesaria para desnaturalizar es mayor que a mayores presiones (Heremans & Smeller, 1998).



**Figura In.15.** Representación esquemática de un diagrama de fases elíptico para una proteína genérica.  $p$ ,  $e$  y  $c$  corresponden a procesos específicos de desnaturalización proteica por presión, enfriamiento y calentamiento, respectivamente. Traducido y adaptado de Smeller (2002).

De todas formas, no se puede perder de vista que la Figura In.15. es una representación simplificada del proceso de desnaturalización proteica, ya que tiene en cuenta solo dos estados posibles (nativa o desnaturalizada) cuando dicho proceso involucra numerosos estados intermedios (Li *et al.* 1976; Smeller, 2002).

El efecto de las APH sobre proteínas de soja ha sido motivo de numerosos estudios. Molina, Papadopoulou y Ledward (2001) trabajaron con fracciones enriquecidas en globulinas  $\beta$ -conglucina y glicinina y las trataron a 200, 400 o 600 MPa durante 15 min a temperatura ambiente. Los autores, a través de estudios de calorimetría diferencial de barrido, encontraron que los tratamientos a 400 y 600 MPa produjeron la desnaturalización completa de ambas fracciones. Zhang *et al.* (2003) informaron que tratamientos con niveles de presión superiores a 300 MPa, durante 10 min a temperatura ambiente, podrían

provocar la disociación de la glicinina. Los mismos autores demostraron que tratamientos a 400 MPa produjeron la desnaturalización completa de la glicinina, y que tratamientos a 500 MPa modificaron la estructura secundaria de la proteína, convirtiendo la organización tipo  $\alpha$ -hélice o lámina- $\beta$  en *random coil*. Puppo *et al.* (2004) demostraron que la aplicación de 200 a 600 MPa, durante 10 min a temperatura ambiente a aislados proteicos de soja (APS) y a fracciones enriquecidas en  $\beta$ -conglucina y glicinina a pH 8,0, produjo un incremento en la hidrofobicidad superficial y agregación proteica, una reducción en el contenido de sulfhidrilos libres y una desnaturalización cercana al 90 % en las proteínas tratadas a 400 o 600 MPa. Cuando los ensayos fueron realizados a pH 3,0 se alcanzó una desnaturalización completa a presiones de 400 MPa. A su vez, los autores informaron cambios en la estructura secundaria de las proteínas hacia estados de mayor desorden. Speroni, Añón y de Lamballerie (2010) trabajaron con APS y con fracciones enriquecidas en las globulinas  $\beta$ -conglucina y glicinina a pH 8,0 sometidas a diferentes niveles de presión (200, 400 o 600 MPa) durante 10 min a temperatura ambiente. A través de estudios de calorimetría diferencial de barrido los autores encontraron una desnaturalización del 77 y del 94 % en  $\beta$ -conglucina y glicinina, respectivamente, luego del tratamiento a 400 MPa. Speroni, de Lamballerie y Añón (2010) y Añón, de Lamballerie y Speroni (2011) encontraron que el grado de desnaturalización fue afectado por la presencia de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{NaCl}$ , con efectos protectores o sensibilizantes dependiendo del nivel de presión y la concentración de sal. A partir de estos trabajos se observa que las proteínas de soja son fuertemente afectadas por niveles de presión iguales o superiores a 400 MPa, siendo el efecto final dependiente de las características del medio (por ejemplo, el pH) y de las condiciones del tratamiento (nivel de presión, temperatura, tiempo).

La adición de iones divalentes, tales como el  $\text{Ca}^{+2}$  o el  $\text{Mg}^{+2}$ , producen la formación de agregados insolubles con las proteínas de soja. La consecuente disminución en la solubilidad proteica limita notablemente la utilización de los APS en la industria alimentaria (Tang *et al.* 2009). Añón, de Lamballerie y Speroni (2012) estudiaron el efecto de la aplicación de APH en la solubilidad y agregación de dispersiones de APS y de fracciones enriquecidas en  $\beta$ -conglucina y glicinina ( $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  a pH 8,0 en *buffer* TRIS-HCl) adicionadas con calcio. Los autores encontraron que la aplicación de APH (entre 400 y 600 MPa) revirtió la insolubilización producida por la incorporación de calcio, así como la ruptura de los grandes agregados en otros de menor tamaño. Este comportamiento solo fue estudiado en presencia de calcio, con lo cual resta conocer si el efecto de las APH es

general y puede observarse con otros minerales, como así también la presencia de cosolventes y los mecanismos que podrían estar involucrados.

Las enzimas son proteínas cuya actividad biológica depende de su sitio activo, el cual queda determinado por la configuración tridimensional de la molécula. La desnaturalización de las enzimas, altera la funcionalidad de las mismas, resultando en un incremento o pérdida de la actividad biológica, así como en cambios en la especificidad al sustrato (Hendrickx *et al.* 1998). El efecto de las APH sobre las enzimas es variado: dependiendo del nivel de presión aplicado y del tipo de enzima, las APH pueden causar inactivación o activación de enzimas (Hoover, 1993). Dicho comportamiento dependerá a su vez del origen de la enzima, del pH y la composición del medio, y de la temperatura. La presencia de solutos puede tener un efecto protector, aunque también puede conducir a una fuerte desestabilización. A su vez, la inactivación de algunas enzimas es reversible cuando los tratamientos con APH se realizan a niveles de presión entre los 100 y 300 MPa. La reactivación luego de la descompresión depende de los cambios conformacionales y fenómenos de agregación sufridos por la proteína. Las chances de reactivación enzimática disminuyen con el incremento de la presión por encima de los 300 MPa (Jaenicke, 1981).

En el procesamiento de alimentos muchas enzimas desempeñan un rol importante debido a que catalizan reacciones que modifican la calidad de los productos. Tradicionalmente la inactivación de las enzimas que tienen efectos negativos se logra a través del tratamiento térmico. Las condiciones utilizadas (temperatura, tiempo, contacto con medio calefactor, etc.) causan alteraciones de los atributos sensoriales y pérdida de nutrientes. Los tratamientos con APH, en este sentido, disminuyen el deterioro de los alimentos y logran, bajo ciertas condiciones, la inactivación enzimática.

Una de las enzimas responsables de la pérdida de calidad sensorial, particularmente en leguminosas y productos derivados, es la lipoxigenasa (LOX). Según la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular la LOX (1.13.11.12) es una oxidoreductasa dioxigenasa que cataliza la hidroperoxidación, mediante la adición de oxígeno molecular, de ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido linoleico, que contienen enlaces *cis*, *cis* - 1,4-pentadienos (Axelrod, Cheesbrough & Laakso, 1981) (Figura In.16).

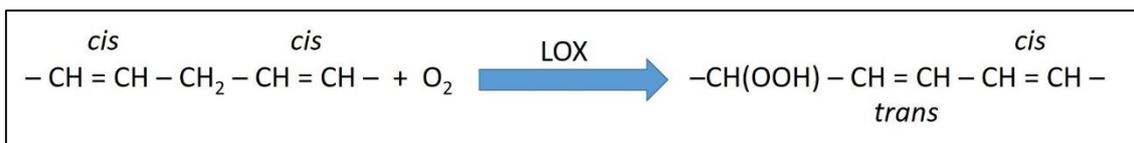


Figura In.16. Reacción primaria catalizada por la enzima LOX. Adaptado de (Axelrod, Cheesbrough & Laakso, 1981).

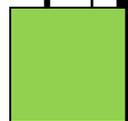
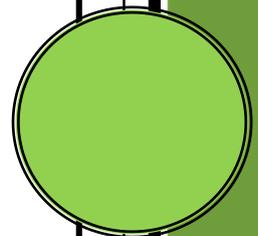
Esta reacción conduce a efectos indeseables en los alimentos, tales como la destrucción de ácidos grasos esenciales, desarrollo de *off-flavors* y sabor amargo y degradación del color (Whitaker, 1972; Eskin *et al.* 1977; Baur *et al.* 1977, Richardson & Hyslop, 1985; Ludikhuyze *et al.* 1998). Por tal motivo es necesaria su inactivación para garantizar la aceptabilidad en términos nutricionales y sensoriales de los productos alimenticios (Tressl & Drawertl, 1973; van der Ven, Matser & van den Berg, 2005). Estudios realizados por Indrawati *et al.* (1999) en extractos crudos de arvejas demostraron la inactivación irreversible de LOX con tratamientos térmicos entre 55 y 70 °C a presión atmosférica, mientras que a temperatura ambiente se necesitaron presiones cercanas a los 500 MPa para lograr su inactivación. Más aun, tratamientos a 200 MPa y a 50 °C produjeron un 10 % de inactivación, mientras que se alcanzó una inactivación del 50 % con presiones mayores a 500 MPa y temperaturas entre 10 y 30 °C.

En LOX proveniente de soja, Tangwongchai, Ledward y Ames (2000) observaron una importante inactivación de LOX en *buffer* TRIS pH 9,0 tratado a 400 MPa y una pérdida total de actividad con tratamientos a 600 MPa en un rango de pH entre 5 – 9. Ludikhuyze *et al.* (1998) encontraron diferentes grados de inactivación de la enzima en *buffer* TRIS a pH 9,0, con tratamientos combinados APH y temperatura con presiones entre 50 y 650 MPa y temperaturas entre 10 y 64 °C, incrementándose la constante de velocidad de inactivación con el aumento de la presión a temperatura constante. A su vez los autores encontraron un aumento de la estabilidad térmica de LOX con la disminución del pH, siendo la máxima estabilidad a pH 5,4, valor correspondiente a su punto isoelectrico. Contrariamente, la baroresistencia de la enzima aumentó con el incremento del pH. Esto pondría de manifiesto que los mecanismos por los cuales la enzima es inactivada por tratamiento térmico son diferentes de aquellos correspondientes a los tratamientos con APH. Heinisch *et al.* (1995) encontraron un 100 % de inactivación de la enzima LOX en *buffers* borato pH 9,0 y TRIS-HCl pH 7,8, inmediatamente medida luego de tratamientos a 550 MPa-0 °C, 600 MPa-5°C, 100 MPa-60 °C, 100 MPa-75 °C y 600 MPa-60 °C, entre otros.

En relación a otros aspectos vinculados a la calidad de alimentos en base a soja, se destacan el control de los factores antitripticos de Kunitz y de Bowman-Birk. Ambos inhibidores de proteasas son generalmente considerados los principales factores antinutricionales presentes en la soja (Sorgentini & Wagner, 1999) al expresar especificidad sobre enzimas involucradas en los procesos digestivos de las proteínas, principalmente sobre la tripsina y la quimotripsina (Liener, 1994). Altos niveles de ambos inhibidores pueden causar la disminución de la digestibilidad proteica (Hackler *et al.* 1965) y causar problemas pancreáticos (Cheftel, Cuq & Lorient, 1985; Holm *et al.* 1992). En relación a esto, Hackler *et al.* (1965) reportaron que el grado de inactivación de los factores antinutricionales para lograr una leche de soja segura y con alto valor nutricional debía ser del 90 %. Como se mencionó anteriormente, (sección I.II) ambos inhibidores presentan una importante resistencia a los tratamientos térmicos. En la literatura existen informes de tratamientos térmicos capaces de alcanzar esos valores, por ejemplo: 93 °C – 60 min, 143 °C – 56 s, 154 °C – 23 s (Kwok, Qin & Tsang, 1993), 100 °C – 40 min, 125 °C – 5min, 143 °C – 60 s (Kwok, Liang & Niranjana, 2002). Sin embargo, la mayoría de los tratamientos térmicos, sobre todos los que combinan altas temperaturas con tiempos largos, afectan otras propiedades como el sabor de las leches (Luttrell *et al.* 1981), la pérdida de vitaminas (Kwok *et al.* 1998) y de aminoácidos como lisina, triptófano y cisteína (Hackler *et al.* 1965; Hackler & Stillings, 1967). También se ha demostrado la estabilidad que presentan ambos inhibidores a los tratamientos con APH realizados a temperatura ambiente, por lo que se han propuesto combinaciones APH-temperatura (van der Ven, Matser, and van den Berg, 2005; Guerrero-Beltrán *et al.* 2009).

De esta forma, la combinación de APH y temperatura resulta una importante alternativa al uso de tecnologías térmicas, tradicionalmente utilizadas para inactivar tanto la enzima LOX como los factores antitripticos, que permitiría preservar la calidad sensorial y nutricional de los alimentos.

# OBJETIVOS



**Objetivo general:** Estudiar los efectos del tratamiento con APH sobre proteínas de APS adicionadas con minerales para generar conocimiento que permita utilizarlas como ingredientes con propiedades funcionales y nutricionales mejoradas.

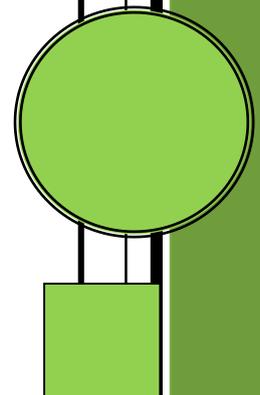
Para lograr este objetivo se plantea estudiar sistemas de distinta complejidad, desde dispersiones acuosas, para aislar efectos y profundizar el conocimiento sobre los mecanismos involucrados, hasta alimentos reales, para verificar la ocurrencia de tales efectos en matrices complejas.

En este contexto nos planteamos como **objetivos específicos:**

- Profundizar el conocimiento sobre los efectos, y los mecanismos involucrados, de los tratamientos con APH sobre las propiedades fisicoquímicas y moleculares de proteínas de APS adicionadas con minerales en distintas condiciones (concentración, pH, cosolventes).
- Estudiar las propiedades tensioactivas, la formación de film interfacial y las propiedades emulsificantes de APS adicionado con calcio y tratado con APH.
- Evaluar la posibilidad de preparar mediante tratamiento combinado de alta presión hidrostática y temperatura leches de soja adicionadas con calcio, mejorando su solubilidad proteica y su estabilidad coloidal, a la vez de lograr la inactivación de la enzima lipoxigenasa y de los factores antinutricionales.
- Analizar los efectos de tratamientos con APH sobre bebidas sin alcohol formuladas con jugo de durazno y APS, adicionadas con calcio.

# Capítulo I

## Caracterización de dispersiones de proteínas de soja con minerales tratadas con altas presiones hidrostáticas



## 1.1. Materiales y métodos

### 1.1.1. Preparación de aislado proteico de soja

Los aislados proteicos de soja (APS) se obtuvieron por solubilización alcalina de las proteínas y posterior precipitación isoeléctrica según la metodología descrita por Speroni, Milesi y Añón (2010). Como materia prima se utilizó harina desgrasada de soja provista por la firma Solae S.A. de Brasil, que por no sufrir tratamiento térmico drástico durante su elaboración contiene proteínas en estado nativo. La harina de soja se dispersó en agua bidestilada en una proporción 1:10 masa en volumen, el pH se ajustó a 8,0 con NaOH 2,0 mol.L<sup>-1</sup> y se agitó durante 90 min a temperatura ambiente con ajuste periódico del pH. Luego de ese tiempo se obtuvo un residuo alcalino insoluble que se separó mediante centrifugación a 10000 g durante 30 min a 4 °C en una centrífuga Avanti modelo J-25 (Beckman Coulter Inc., California, EEUU). El precipitado se descartó y el sobrenadante obtenido se acidificó hasta pH 4,5 con HCl 2,0 mol.L<sup>-1</sup> y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 15 min, obteniéndose un precipitado que fue separado por centrifugación a 3750 g durante 15 min a 4 °C (centrífuga Avanti modelo J-25, Beckman Coulter Inc., California, EEUU). El sobrenadante fue descartado y el precipitado se lavó con agua destilada y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Este precipitado se resuspendió a pH 7,0 por agregado de NaOH 2,0 mol.L<sup>-1</sup>. Posteriormente se congeló a -80 °C y se liofilizó (liofilizador Heto FD 4 conectado a una bomba rotativa a paletas Vacuubrand RZ 6, Alemania) para obtener el APS. Se determinó el contenido proteico de APS mediante el método de Kjeldahl (Kjeldahl, 1883) utilizando un factor de conversión 5,85. La digestión y destilación de las muestras se realizó en una unidad BÜCHI modelo K-350 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Suiza). El valor obtenido fue  $82,2 \pm 0,4$  %.

### 1.1.2. Caracterización molecular de APS mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se analizó el APS mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (PAGE, *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). En esta modalidad las proteínas son puestas en contacto con el tensioactivo dodecilsulfato de sodio (SDS), formando complejos desnaturizados con carga negativa. Dado que estos complejos proteína/SDS presentan similar relación carga/masa, la separación en gel queda determinada fundamentalmente por las diferencias en el peso molecular de los polipéptidos, con menor movilidad para los polipéptidos de mayor peso molecular, y viceversa.

### 1.1.2.1. Reactivos

Se utilizó el sistema de reactivos descritos por Laemmli (1970). Los reactivos utilizados fueron:

1. *Buffer* de electrodo: hidroximetil aminometano-HCl (TRIS-HCl) 0,025 mol.L<sup>-1</sup>, glicina 0,192 mol.L<sup>-1</sup>, SDS 0,1 %p/v, pH 8,3.
2. *Buffer* de gel apilador: TRIS 0,5 mol.L<sup>-1</sup>, SDS 0,4 %p/v, pH 6,8.
3. *Buffer* de gel separador: TRIS 1,5 mol.L<sup>-1</sup>, SDS 0,4 %p/v, pH 8,8.
4. *Buffer* de muestra (2X): TRIS-HCl 0,185 mol.L<sup>-1</sup> pH 8,8, glicerol 12,5 %v/v, SDS 0,1 %p/v, azul de bromofenol 0,05 %p/v con o sin agregado de 2-mercaptoetanol (2-ME) 5 %v/v para obtener condiciones reductoras o no reductoras respectivamente.

### 1.1.2.2. Metodología

Las muestras se prepararon dispersando 5,6 mg de APS en 1 mL de *buffer* de muestra. Se agitaron en vórtex para dispersarlas en forma homogénea, se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min en una centrífuga refrigerada Hermle modelo Z 233 MK-2 (Gosheim, Alemania) y se sembraron 5 µL (aproximadamente 30 µg de proteína) por calle. Las muestras en condiciones reductoras fueron colocadas en un baño de agua a 100 °C durante 1 min previo al paso de centrifugación. Posteriormente se centrifugaron y sembraron de la misma manera. Se utilizaron geles de poliacrilamida de concentración constante de acrilamida 12 %p/v con gel apilador de concentración de acrilamida 4 %p/v (Petrucci & Añón, 1994). Los patrones de masa molecular utilizados contuvieron: fosforilasa b (97 kDa), seroalbúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y α-lactoalbúmina (14,4 kDa) (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Las proteínas patrón fueron solubilizadas en *buffer* de muestra con 2-ME y sometidas al mismo tratamiento que recibieron las muestras. Las electroforesis fueron realizadas en miniplacas con un equipo BIO-RAD, modelo Mini Protean II (BIO-RAD life science, EEUU) con separadores de 1 mm de espesor. Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo a una corriente de 30 mA por gel.

### 1.1.2.3. Coloración

Los geles fueron fijados y teñidos al mismo tiempo con Coomassie Brilliant Blue R-250 (Anedra, Argentina) 0,2 %p/v en agua/metanol/ácido acético (5:5:2) durante 12 h y desteñidos con una mezcla 25 %v/v metanol y 10 %v/v ácido acético a temperatura ambiente.

### 1.1.2.4. Obtención de las imágenes y análisis de los geles

Las imágenes de los geles fueron obtenidas mediante un scanner HP Scanjet G2710 y analizadas con el software ImageJ (V1.48).

### 1.1.3. Preparación de dispersiones de APS adicionadas con minerales

Se prepararon dispersiones de APS, de concentración 10 g de proteína.L<sup>-1</sup> (según trabajos previos Puppo *et al.* 2004; Añón de Lamballerie y Speroni, 2012), dispersando en agua bidestilada el aislado obtenido según sección 1.1.1. Cuando fue necesario se ajustó el pH a 7,0 y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. Posteriormente se agregaron minerales (calcio, magnesio o hierro) en concentraciones entre 1,5 y 5 mmol.L<sup>-1</sup> a partir de soluciones madre de concentración 1,0 mol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub> o 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>. La solución madre de MgCl<sub>2</sub> fue provista por Sigma, St. Louis, EEUU, mientras que las soluciones de CaCl<sub>2</sub> y FeSO<sub>4</sub> fueron preparadas a partir de las drogas sólidas CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O y FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O respectivamente (Sigma, St. Louis, EEUU). Para el caso del calcio se amplió el rango de concentraciones utilizadas hasta 7,5 mmol.L<sup>-1</sup> y se ensayaron además distintos valores de pH: 5,9; 6,4; 7,0 y 8,0. Existen numerosas investigaciones que involucran proteínas de soja a pH 8,0, con lo cual realizar ensayos a ese valor de pH nos genera un punto de comparación importante. No obstante, los alimentos presentan valores de pH muy variados, y mayormente ácidos. Por lo tanto, se buscó evaluar el efecto del tratamiento en un rango de pH tal que permita el desarrollo de ingredientes alimentarios con gran versatilidad. Los valores de pH 5,9 y 6,4 fueron la resultante del efecto acidificante del calcio mientras que el valor de pH 7,0 se eligió con el objetivo de ampliar el rango de estudio incluyendo un valor de pH neutro. Los valores de pH 7,0 y 8,0 fueron alcanzados mediante el agregado de NaOH o HCl. En todos los casos el pH fue medido mediante un electrodo de vidrio S200CIT Sensorex (Garden Grove, CA, EEUU) conectado a un pHmetro ION 510 Series OAKTON Instruments (Vernon Hills, IL, EEUU). La temperatura a la cual se realizaron las medidas (20 ± 2 °C) fue determinada mediante una sonda de

temperatura de inmersión ATC de acero inoxidable modelo HI 7662 (HANNA Instruments, Woonsocket, EEUU).

#### 1.1.4. Tratamiento con altas presiones hidrostáticas (APH)

Las dispersiones de APS, con o sin minerales y con valores de pH debidamente ajustados, fueron colocadas en recipientes de polipropileno de 10 mL, cuidando de no dejar aire en su interior durante el llenado. Previo al tratamiento con APH los envases fueron sellados al vacío en bolsas plásticas de material multilaminado (tasa de transmisión de O<sub>2</sub>: 6-14 cm<sup>3</sup>.m<sup>-2</sup>.24 h<sup>-1</sup> a 22 - 24°C y a 0 % Humedad relativa, Cryovac BB2800, Sealed Air, Buenos Aires, Argentina). Posteriormente los mismos fueron colocados en un canasto de aluminio y este fue introducido en el cilindro de alta presión de un equipo de alta presión hidrostática marca Stansted Fluid Power Ltd. modelo Iso-Lab System, FPG 9400:922 (Stansted, Reino Unido) que se encuentra instalado en el Instituto Tecnología de Alimentos de INTA Castelar. Este sistema presenta un cilindro de alta presión con una capacidad de 2 L, una presión máxima de trabajo de 900 MPa y un rango de temperatura de trabajo -20 a 120 °C. El fluido de compresión utilizado consistió en una mezcla de propilenglicol:agua en una relación 30:70 volumen en volumen. Los tratamientos fueron realizados a 600 ± 5 MPa durante 5 min a una temperatura inicial de 20 °C, alcanzándose una temperatura final máxima de 33,5 °C, debido al desarrollo de calor por la compresión. La velocidad de compresión fue de 5 MPa.s<sup>-1</sup> y la de despresurización, de 20 MPa.s<sup>-1</sup>.

#### 1.1.5. Diseño experimental

Las dispersiones proteicas se caracterizaron evaluando el efecto del tipo de sal del mineral adicionado: CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> o FeSO<sub>4</sub> a pH 7,0. El efecto del pH fue evaluado en muestras adicionadas con CaCl<sub>2</sub> a valores de pH: 5,9; 6,4; 7,0 y 8,0. El rango de concentración de los iones estuvo comprendido entre 1,5 y 7,5 mmol.L<sup>-1</sup>. El tratamiento con APH evaluado fue (600 MPa-5 min-20 °C). Todas las muestras fueron realizadas por triplicado. A su vez todas las determinaciones analíticas fueron realizadas por triplicado.

#### 1.1.6. Solubilidad

##### 1.1.6.1. Dispersiones adicionadas con calcio o magnesio

La cantidad de proteína soluble fue determinada por el método del ácido bicinónico (BCA) (Smith *et al.* 1985), utilizando un kit comercial (Sigma, St. Louis, EEUU). El principio del ensayo del BCA es similar al procedimiento descripto por Lowry *et al.* (1951),

que se basa en la formación de complejos proteína-Cu<sup>+2</sup>, seguida de la reducción del Cu<sup>+2</sup> a Cu<sup>+1</sup> producida por cisteína, cistina, triptófano, tirosina y enlaces peptídicos a pH alcalino, siendo la cantidad de cobre reducido proporcional a la proteína soluble presente. El BCA forma un complejo púrpura-azulado con el Cu<sup>+1</sup> a pH alcalino, midiéndose la absorbancia del mismo a una longitud de onda de 562 nm. El método del BCA es más sensible, el complejo coloreado es más estable y presenta menos interferencias que el método de Lowry. Se realizó una adaptación del mismo en microplacas de 96 pocillos transparentes.

#### 1.1.6.2. Dispersiones adicionadas con hierro

El hierro constituye una interferencia en el método del BCA a las concentraciones ensayadas, razón por la cual se escogió el método de Bradford para realizar la determinación de proteína soluble en estas muestras. El método de Bradford (Bradford, 1976), se basa en la unión del colorante azul brillante de Coomassie G-250 (Anedra, San Fernando, Argentina) a las proteínas, produciendo un corrimiento en el máximo de absorbancia de 465 a 595 nm, siendo ésta última longitud de onda la utilizada para la determinación colorimétrica.

#### 1.1.6.3. Determinación de solubilidad proteica

Para realizar las medidas de solubilidad proteica las muestras fueron centrifugadas a 10000 g durante 20 min a 4 °C en una centrifuga Avanti modelo J-25 (Beckman Coulter Inc., California, EEUU). Inmediatamente luego de finalizada la centrifugación se tomó una alícuota del sobrenadante para determinar su contenido de proteína. La curva de calibración se preparó utilizando como proteína patrón albúmina de suero bovino, fracción V (Sigma, St. Louis, EEUU) disuelta en agua bidestilada. Las lecturas de absorbancia fueron realizadas utilizando un lector de placas Synergy HT™ (BIOTEK Instruments, Winooski, EEUU) a una longitud de onda de 562 nm para las muestras cuantificadas por BCA y un espectrofotómetro Beckman DU 650 (Beckman Co., EEUU) a una longitud de onda de 595 nm para aquellas determinadas por Bradford. Los resultados se expresaron como:

$$S\% = P_s \times 100 / P_t$$

siendo S% el porcentaje de proteína soluble (definida como aquella que se encuentra en el sobrenadante luego del proceso de centrifugación en las condiciones mencionadas

anteriormente en relación a la proteína total),  $P_S$  la concentración proteica en el sobrenadante en  $\text{g.L}^{-1}$  y  $P_I$  la concentración inicial de proteína ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ).

$$\text{IS}\% = (S_{\text{APH}} - S_0) \times 100 / S_0$$

Siendo IS% el incremento relativo en el porcentaje de proteína soluble,  $S_0$  el porcentaje de proteína soluble antes del tratamiento con APH y  $S_{\text{APH}}$  el porcentaje de proteína soluble después del tratamiento con APH, bajo las mismas condiciones de concentración de mineral adicionado y APH.

#### 1.1.7. Determinación del potencial- $\zeta$

Un coloide o sistema coloidal es un sistema formado por dos o más fases, una continua, normalmente fluida, y otra dispersa en forma de partículas generalmente sólidas. Las interacciones que se establecen entre dos partículas coloidales son el resultado de las interacciones que sufre una partícula con todas las vecinas, así como también con el medio circundante (Hunter, 1986; Israelachvili, 1992). Una carga superficial en contacto con una solución de un electrolito se ve rodeada e interaccionando con iones de carga opuesta (contra-iones) mientras que los iones de igual carga (co-iones) son repelidos. Normalmente la distribución de contra-iones alrededor de una carga eléctrica suele dividirse en una región interna y una región externa. En la región interna (normalmente conocida como capa de Stern) la atracción entre los contra-iones y la superficie cargada es fuerte y la capa es relativamente inmóvil, mientras que en la región externa la atracción es mucho más débil y la capa presenta cierta movilidad (comúnmente llamada capa difusa) (Evans & Wennerstrom, 1994). A ésta distribución de iones alrededor de una carga superficial se la suele llamar doble capa eléctrica. El espesor de esta doble capa depende del tipo y concentración de los iones en solución. Dentro de la capa difusa existe un límite teórico dentro del cual los iones y la partícula cargada forman una entidad estable y se moverán juntas, mientras que cualquier ion por fuera de dicho límite permanecerá en su lugar. A éste límite teórico se le suele llamar plano de deslizamiento (*Slipping plane*). Existe un potencial entre la superficie de las partículas y el líquido de dispersión, el cual presenta un valor máximo en la superficie y disminuye gradualmente con la distancia, aproximándose a cero fuera de la capa difusa. El potencial en el plano de deslizamiento se conoce como potencial- $\zeta$  (Figura I.1.).

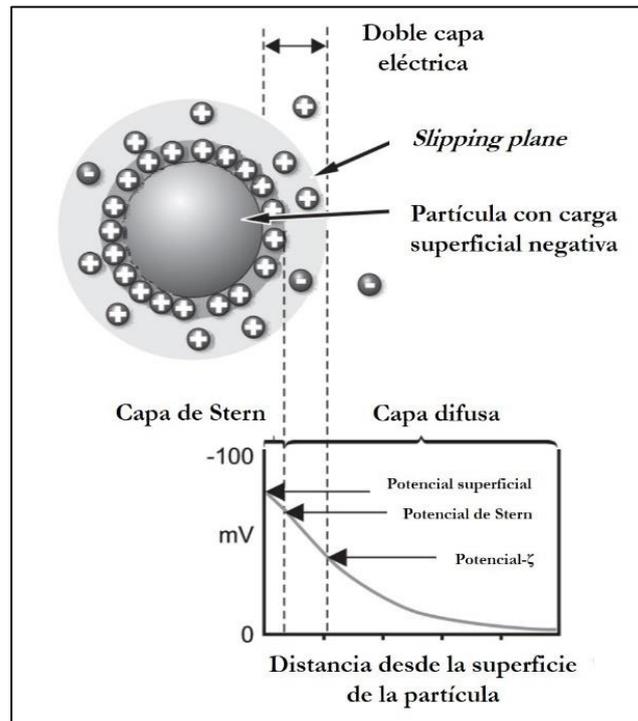


Figura I.1. Representación esquemática de la distribución de iones positivos alrededor de una partícula negativa en donde se muestra la variación del potencial, desde la superficie de la misma al infinito.

La magnitud del potencial- $\zeta$  es una buena indicación de la estabilidad de un sistema coloidal. Si las partículas en suspensión tienen valores grandes de potencial- $\zeta$  (en general mayores a  $\pm 30$  mV) tenderán a repelerse entre sí. Partículas con valores de potencial- $\zeta$  más positivos que  $+ 30$  mV o más negativos que  $- 30$  mV normalmente son consideradas estables (Sherman, 1970). En caso contrario, la probabilidad de que las partículas interactúen y floculen se incrementa. Por tal motivo uno de los factores que más afecta la carga que presentarán las partículas en suspensión, y por ende el valor del potencial- $\zeta$ , es el pH. Si se considera una partícula en suspensión con un valor de potencial- $\zeta$  negativo y se alcaliniza el medio, dicha partícula adquirirá más carga negativa y el valor del potencial- $\zeta$  se hará más negativo. Si, por otra parte, el medio se acidifica, se alcanzará un momento en el cual se habrá neutralizado la carga negativa (punto isoeléctrico, pI) y cualquier adición posterior creará un exceso de carga positiva sobre la partícula. Una curva típica del potencial- $\zeta$  en función del pH es el que se muestra en la Figura I.2.

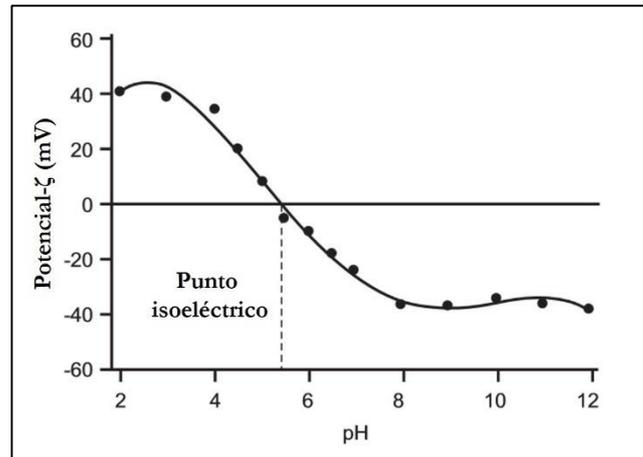


Figura I.2. Curva típica en donde se muestra la variación del potencial-ζ con el pH

#### 1.1.7.1. Metodología

Cuando se aplica un campo eléctrico a través de una solución electrolítica las partículas cargadas son atraídas hacia los electrodos de carga opuesta. A este movimiento se le opone una resistencia que tiene su origen en la viscosidad del medio. Cuando se alcanza un equilibrio entre estas fuerzas opuestas las partículas se mueven a velocidad constante. Dicha velocidad depende a su vez de la intensidad del campo eléctrico, la constante dieléctrica y la viscosidad del medio, y del potencial-ζ de la partícula. La velocidad de una partícula expuesta a un campo eléctrico se conoce comúnmente como movilidad electroforética. La conversión de los valores de movilidad electroforética medida a valores de potencial-ζ se realiza utilizando la ecuación de Henry,

$$U_e = 2 \epsilon \zeta f(Ka) / 3 \eta$$

donde  $U_e$  es la movilidad electroforética,  $\epsilon$  es la constante dieléctrica,  $\zeta$  es el potencial-zeta,  $f(Ka)$  es la función de Henry y  $\eta$  es la viscosidad. Para el caso de soluciones acuosas de concentración electrolítica media (mayor a  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>) y partículas con un tamaño mayor a  $0,2 \mu\text{m}$  se utiliza un valor de 1,5 para la función de Henry, conocida como aproximación de Smoluchowski. Para la realización de la medición, la muestra se coloca en una celda capilar que contiene dos electrodos, uno en cada extremo de la misma, a través de los cuales se aplica una diferencia de potencial (Figura I.3.). Como resultado las partículas se mueven hacia el electrodo de carga opuesta a una determinada velocidad, la cual se expresa como su movilidad electroforética.

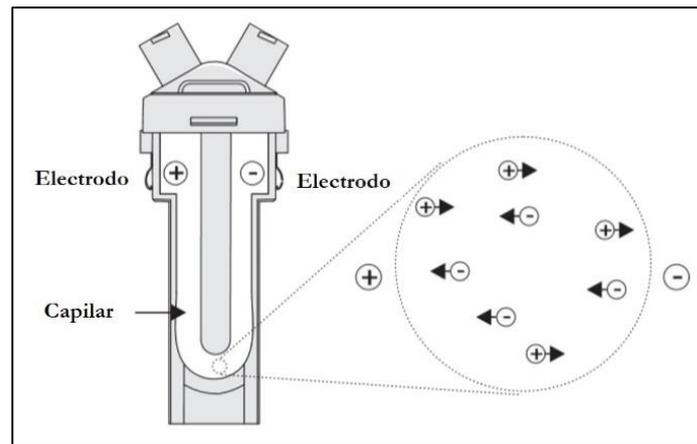


Figura I.3. Representación de una celda típica para la determinación de potencial- $\zeta$

Las determinaciones se realizaron en un equipo de dispersión dinámica de luz láser Zetasizer Nano-Zs (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). El equipo consta de un haz de luz láser el cual se divide en dos, de manera tal de tener un haz incidente y otro de referencia. El haz incidente atraviesa la muestra contenida en la cubeta y a través de un sensor ubicado en un ángulo de  $17^\circ$  se detecta la luz dispersada por las partículas. Cuando se aplica un campo eléctrico a la celda las partículas comienzan a moverse provocando que la intensidad de la luz dispersada fluctúe a una frecuencia proporcional a la velocidad de las mismas. A través de un detector se envía la información a un procesador de señales digital conectado a un ordenador en el cual, mediante el *software* Zetasizer Nano, se produce un espectro de frecuencias a partir del cual se calcula la movilidad electroforética y finalmente el potencial- $\zeta$ . Previo a cada medida el equipo automáticamente corrige la intensidad de luz que llega al detector mediante un atenuador de manera tal que la determinación sea satisfactoria (Figura I.4.). Las muestras a las que se les determinó el potencial- $\zeta$  fueron dispersiones de APS enriquecidas con calcio, en las cuales se observó efecto de la aplicación de APH sobre la solubilidad proteica. Luego de ajustar debidamente el pH, las muestras fueron centrifugadas en las mismas condiciones que las utilizadas para la determinación de proteína soluble y los sobrenadantes fueron colocados en celdas plásticas DTS1061 (Malvern, Zetasizer Nano Series). Durante el llenado de las mismas se controló que no quedaran burbujas de aire en su interior que pudieran interferir con la medición. Posteriormente la cubeta fue colocada en el equipo y termostalizada a  $20^\circ\text{C}$  durante 2 min. Cada una de las determinaciones realizadas fueron el resultado de 8 medidas consecutivas.

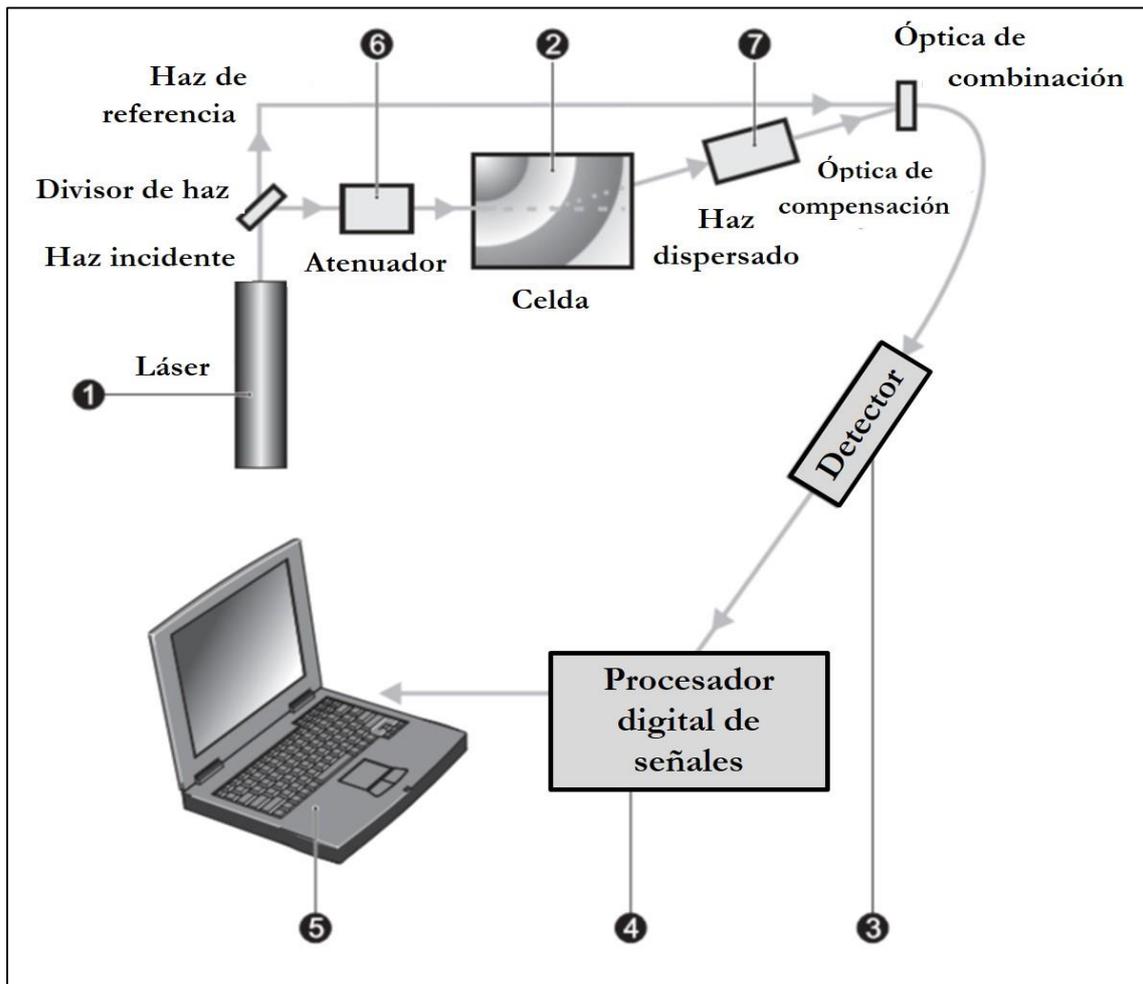


Figura I.4. Esquema básico que muestra el fundamento del funcionamiento del Zetasizer Nano-Zs para la determinación del potencial- $\zeta$ . 1) Láser, 2) Celda, 3) Detector, 4) Procesador digital de señales, 5) PC, 6) Atenuador, 7) Elementos ópticos de compensación (corrigen cualquier diferencia asociada a la pared de la celda y/o la refracción del medio dispersante).

#### 1.1.8. Determinación de la concentración de calcio libre

La determinación de la concentración de calcio libre fue realizada utilizando un electrodo compuesto ion selectivo modelo HI4104 (HANNA Instruments, Woonsocket, EEUU) conectado a un pH-metro modelo ION 510 Series (OAKTON Instruments, Vernon Hills, EEUU). El dispositivo está formado por una camisa externa de PVC dentro de la cual se ubica un electrodo de referencia de Ag/AgCl con un gel electrolítico de iones  $\text{Cl}^-$  solidario a un electrodo de membrana de polímero orgánico sensible a iones  $\text{Ca}^{+2}$  (intercambiador de iones). La camisa externa se rellena con una solución de KCl  $3,5 \text{ mol.L}^{-1}$ . El intercambiador de iones orgánico se considera como un transportador ionóforo capaz de ligar y transportar el ion calcio a través de la región apolar de la membrana. Esto provoca un desbalance de cargas entre la solución y el sensor ubicado en la celda interna, siendo los cambios en el voltaje función de la actividad del ion en la solución. Previo a la realización de las medidas

es necesario fijar la fuerza iónica de las soluciones mediante el agregado de un ajustador de fuerza iónica (ISA, del inglés *Ionic Strength Adjuster*) de manera tal que el voltaje medido sea proporcional a la concentración del ion en la solución.

#### 1.1.8.1. Metodología

Las determinaciones se realizaron sobre dispersiones de APS enriquecidas con calcio a diferentes valores de pH. En primer lugar se ajustó la fuerza iónica de las mismas mediante el agregado de solución ISA HI4004-00 (HANNA Instruments, Woonsocket, EEUU) y posteriormente se ajustó el pH a valores de 5,9; 6,4; 7,0 y 8,0 mediante el agregado de NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. La calibración del electrodo se realizó con soluciones de Ca<sup>+2</sup> de concentraciones variables entre 2,5 x 10<sup>-5</sup> y 2,5 x 10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup> preparadas a partir de una solución madre 0,1 mol.L<sup>-1</sup> provista por HANNA Instruments. La fuerza iónica de los patrones también fue ajustada mediante el agregado de solución ISA. Para la determinación se colocaron 20 mL de dispersión en un vaso de precipitado de 3 cm de diámetro y 5,5 cm de altura y se mantuvo en agitación controlada a velocidad constante a temperatura ambiente durante toda la medición. Se introdujo la membrana selectiva un centímetro por debajo de la superficie libre de la dispersión hasta estabilización de la lectura. Con los datos obtenidos se calculó la relación calcio libre/calcio total, y se graficó dicho cociente en función del calcio adicionado.

#### 1.1.9. Análisis de estabilidad física

Las muestras fueron evaluadas utilizando un analizador óptico vertical de barrido QuickScan (Beckman-Coulter inc., Miami, EEUU), basado en la aplicación de una fuente lumínica con una longitud de onda de 850 nm a un tubo de vidrio transparente que contiene la dispersión. El aparato cuenta con dos detectores, uno ubicado detrás de la muestra que recibe la luz transmitida a través de la misma (ángulo de 0 °), y el otro colocado a un ángulo de 135 ° que mide la luz dispersada. La fuente de luz y ambos detectores se mueven a lo largo de todo el tubo midiendo la dispersión en forma periódica (Figura I.5.). Las medidas que se obtuvieron fueron cinéticas de porcentaje de luz transmitida (%T) a través de la muestra en función de la altura de la muestra (53 mm). En la Figura I.6. se presenta un gráfico típico de la cinética de variación de %T en función de la altura de la muestra.

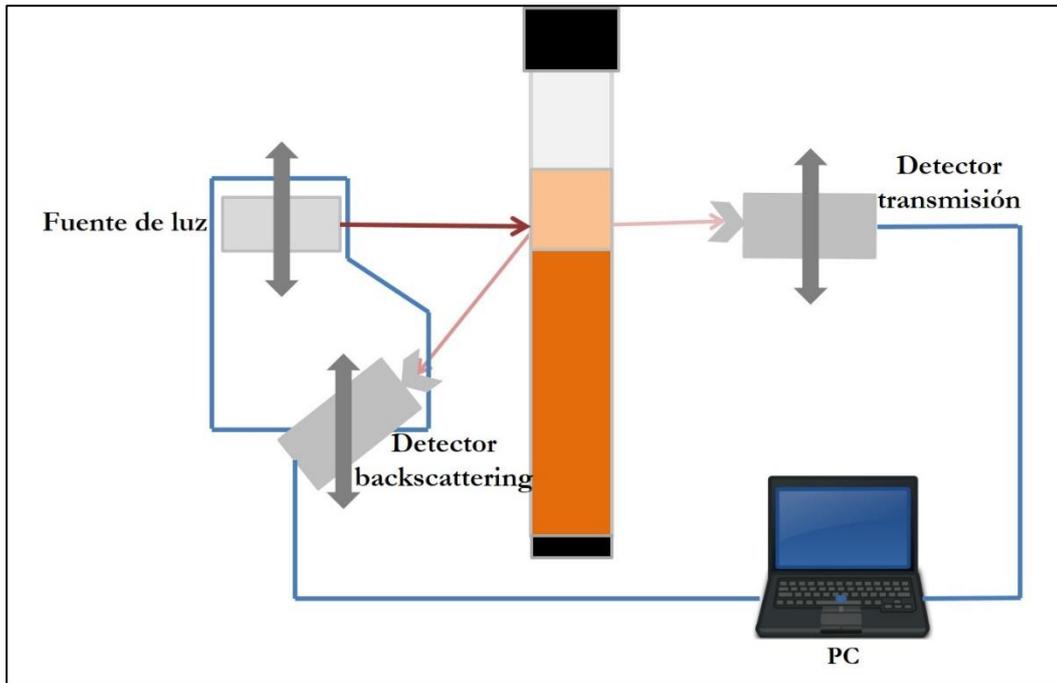


Figura I.5. Esquema básico que muestra el fundamento del funcionamiento del analizador óptico de barrido vertical

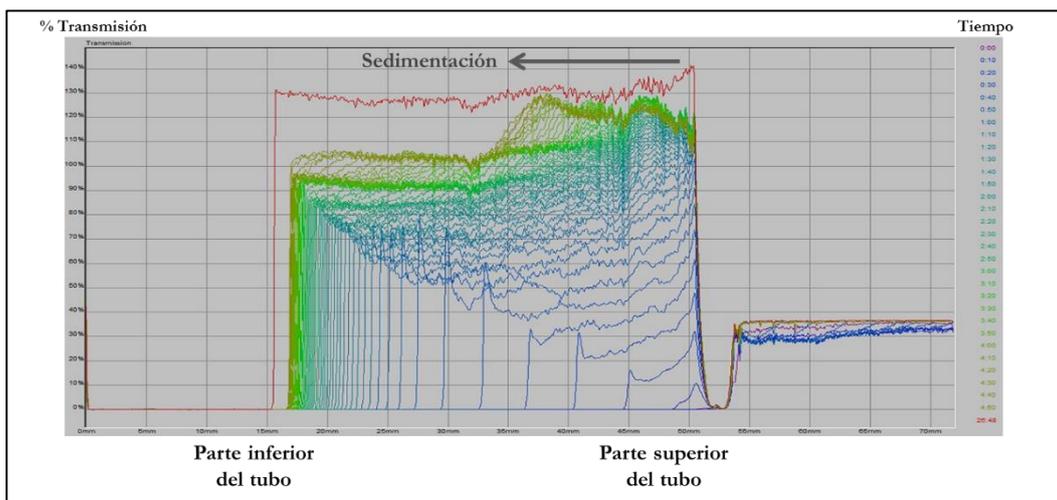


Figura I.6. Gráfico típico de la cinética de variación de transmitancia en función de la longitud del tubo para una dispersión inestable.

Dependiendo de la estabilidad de las muestras el porcentaje de luz transmitida en la zona superior del tubo aumentará conforme se produzca la precipitación de los complejos proteína de soja-calcio, siendo mayor el frente de separación cuanto más inestable sea la muestra.

#### 1.1.9.1. Metodología

Para la construcción de las cinéticas se seleccionaron las muestras en las cuales el efecto de la APH sobre la reversión de la insolubilidad proteica fue significativo y de gran magnitud. También se analizó una condición particular en la que no se observó efecto del tratamiento con APH sobre la solubilidad, pero sí un incremento notorio de la estabilidad detectado a simple vista, de manera de tratar de elucidar la relación existente entre ambos parámetros. Para ello se colocaron 6 mL de dispersión en la celda de medida, que fue inmediatamente colocada dentro del equipo. Se realizó una medida cada 5 min durante 5 h. Pasado ese tiempo se mantuvo la dispersión almacenada a temperatura ambiente y se realizó una medida adicional a las 24 h. A partir de los valores obtenidos se graficaron las cinéticas de %T a 25, 30, 40 y 50 mm de altura tomados desde la base de la celda de vidrio. Por otra parte, como una medida indirecta de turbidez se determinó la transmitancia a tiempo 0 en todo el largo del tubo.

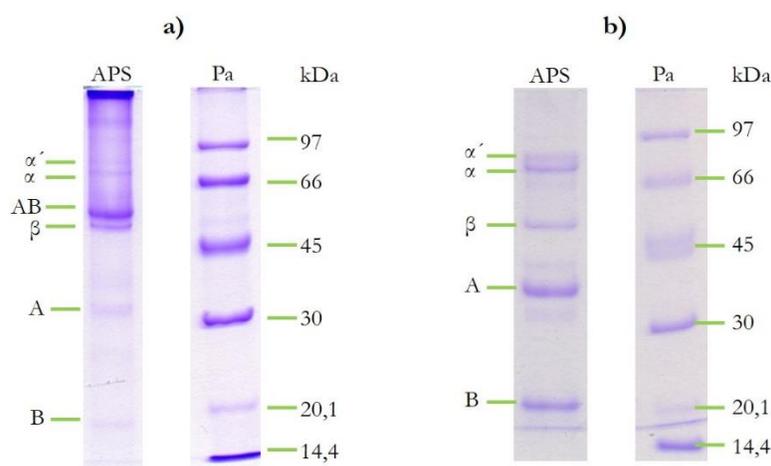
#### 1.1.10. Análisis estadístico

Los datos correspondientes a la determinación de solubilidad proteica, potencial- $\zeta$ , concentración de calcio libre y transmitancia a tiempo 0 fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA). Se analizaron las diferencias entre medias de cada muestra mediante el test de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) utilizando el software Origin 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EEUU).

## 1.2. Resultados y discusión

### 1.2.1. Caracterización molecular de APS mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los perfiles de las SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras correspondientes a las proteínas de APS se muestran en la Figura I.7.



**Figura I.7. a) SDS-PAGE; b) SDS-PAGE + 2-ME de APS. Pa: proteínas de masa molecular (kDa) conocida.**

En condiciones no reductoras (Figura I.7., panel a)) se observaron agregados proteicos de alto peso molecular que no ingresaron al gel, agregados solubles de masa molecular superior a los 100 kDa, los polipéptidos  $\alpha'$  ( $\approx 72$  kDa),  $\alpha$  ( $\approx 68$  kDa) y  $\beta$  ( $\approx 52$  kDa) pertenecientes a la globulina  $\beta$ -conglucina (Thanh & Shibasaki, 1976), la subunidad AB ( $\approx 55$  kDa) de la globulina glicinina y polipéptidos de menor masa molecular principalmente los polipéptidos ácidos (A) ( $\approx 37 - 32$  kDa) y básicos (B) ( $\approx 20$  kDa) de glicinina que se encontraban libres. Estos resultados son acordes a los de Badley *et al.* (1975); Kitamura, Takagi y Shibasaki (1976); Mori, Utsumi e Inaba (1979); Staswick, Hermodson y Nielson (1981, 1984).

En condiciones reductoras, dadas por la presencia de 2-ME (Figura I.7., panel b)), desaparecieron del perfil electroforético los agregados que no ingresaban al gel, los agregados solubles de alta masa molecular y la banda correspondiente a la subunidad AB de glicinina, especies que estarían estabilizadas por puentes disulfuro. Se siguieron observando las bandas características de los polipéptidos  $\alpha'$ ,  $\alpha$  y  $\beta$  de  $\beta$ -conglucina y se intensificaron las bandas correspondientes a los polipéptidos A y B de glicinina. La cuantificación de la intensidad de las bandas en el gel mostraron que las proporciones de  $\beta$ -conglucina y glicinina fueron similares,

en concordancia con lo esperado para un APS obtenido bajo condiciones habituales y con los resultados encontrados por Scilingo y Añón (2004).

### 1.2.2. Efecto del tratamiento con APH sobre la solubilidad proteica de dispersiones de APS adicionadas con $\text{CaCl}_2$ , $\text{MgCl}_2$ o $\text{FeSO}_4$ a pH 7,0

El efecto de la adición de minerales a dispersiones de APS con (600 MPa-5 min-20 °C) o sin (0,1 MPa) tratamiento con APH se muestra en la Figura I.8.

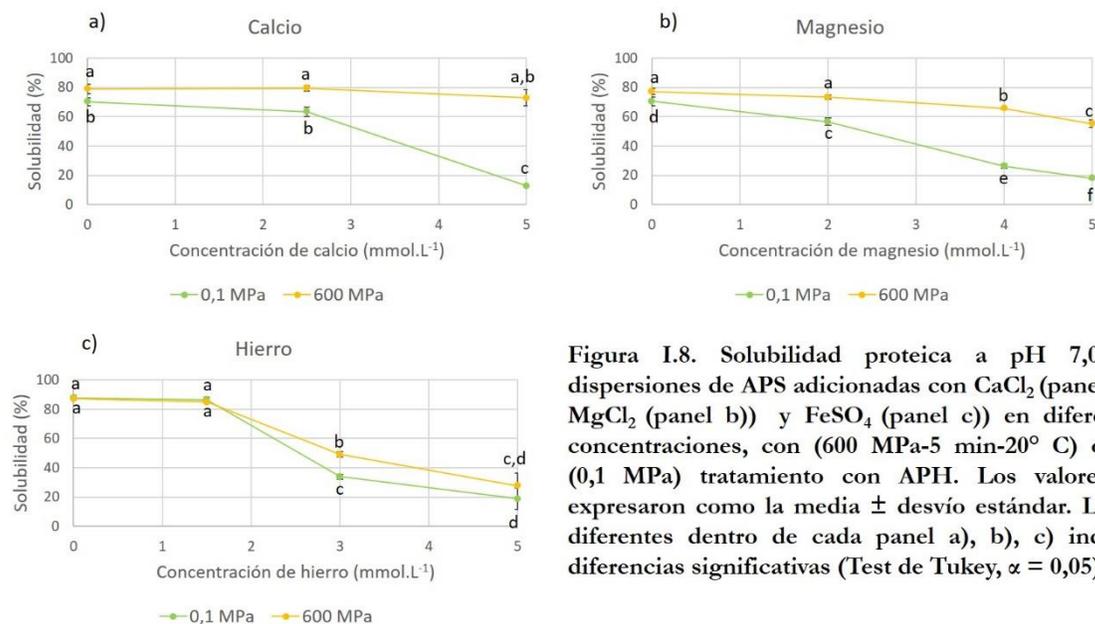


Figura I.8. Solubilidad proteica a pH 7,0 en dispersiones de APS adicionadas con  $\text{CaCl}_2$  (panel a)),  $\text{MgCl}_2$  (panel b)) y  $\text{FeSO}_4$  (panel c)) en diferentes concentraciones, con (600 MPa-5 min-20° C) o sin (0,1 MPa) tratamiento con APH. Los valores se expresaron como la media  $\pm$  desvío estándar. Letras diferentes dentro de cada panel a), b), c) indican diferencias significativas (Test de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ).

La adición de  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  y  $\text{FeSO}_4$  produjo la disminución de la solubilidad proteica en las dispersiones sin tratamiento con APH, siendo la magnitud de la insolubilización dependiente de la concentración y del tipo de sal utilizada. La solubilidad resultó menor o igual al 20 % cuando la concentración de mineral adicionado fue de 5 mmol.L<sup>-1</sup>. Iones divalentes como el  $\text{Ca}^{+2}$  o el  $\text{Mg}^{+2}$  se unen a las proteínas de soja a través de residuos aminoácidos cargados negativamente (grupos carboxilato presentes en los ácidos aspártico y glutámico) y a través de grupos imidazol presentes en la histidina (Appu Rao & Narasinga Rao, 1976; Kroll, 1984; Liu *et al.* 2011). El análisis de la interacción entre el hierro y las proteínas de soja es más complejo producto de la oxidación del ion  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$  que ocurre durante la preparación y el desarrollo del ensayo, debido a que su potencial de reducción estándar ( $E^\circ_{\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}} = 0,77 \text{ V}$ ) es menor que el de reducción del  $\text{O}_2$  ( $E^\circ_{\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}} = 1,23 \text{ V}$ ). De esta manera el ion  $\text{Fe}^{+2}$  se oxidaría a

expensas de la reducción del  $O_2$  (Brown *et al.* 2009) y las proteínas se enfrentarían a proporciones de  $Fe^{+2}$  y  $Fe^{+3}$  que no fueron constantes ni controladas durante estos ensayos.

El tratamiento con APH revirtió la insolubilización producida por el agregado de los minerales en las muestras adicionadas con calcio y magnesio en todas las concentraciones ensayadas (Figura I.8., paneles a) y b)). El efecto fue mayor en las muestras con calcio que en aquellas con magnesio, produciéndose un incremento relativo en la solubilidad (IS%) del 470 % para el calcio *vs.* 207 % para el magnesio, a una concentración de 5 mmol.L<sup>-1</sup>. Más aun, las dispersiones adicionadas con 5 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> tratadas con APH presentaron la misma solubilidad que las dispersiones sin calcio sin tratamiento. En el caso de las muestras adicionadas con hierro el tratamiento con APH revirtió parcialmente la insolubilización a una concentración de 3 mmol.L<sup>-1</sup>, con un incremento relativo en la solubilidad del 45 % pero no fue significativo a una concentración de 5 mmol.L<sup>-1</sup> (Figura I.8., panel c)). Berner y Miller (1985) y Lynch *et al.* (1994) estudiaron la biodisponibilidad del hierro y propusieron la formación de complejos insolubles con β-conglicina. La desnaturalización incompleta (75 %) de esta proteína a 600 MPa (Speroni, Añón & de Lamballerie, 2010) podría explicar la existencia de sitios de unión específicos para el hierro en dominios con estructura secundaria o terciaria resistentes a la alta presión, formando complejos insolubles que muestren poca variación luego del tratamiento con APH.

**Estos resultados indican que el tratamiento con APH revierte la insolubilización de las proteínas de APS producida por el agregado de minerales. A su vez, la magnitud del efecto depende del tipo de mineral (el mayor efecto se encontró para el calcio y el menor para el hierro).**

Dado que el mayor efecto de la aplicación de APH sobre la solubilidad proteica se produjo en las dispersiones adicionadas con calcio, se seleccionaron estas últimas para continuar el estudio y profundizar el análisis.

### 1.2.3. Efecto del tratamiento con APH sobre la solubilidad de dispersiones de APS adicionadas con CaCl<sub>2</sub> a diferentes valores de pH

Con el objetivo de profundizar el conocimiento acerca del efecto del tratamiento con APH sobre la solubilidad de dispersiones de APS adicionadas con CaCl<sub>2</sub> se ensayaron diferentes valores de pH (5,9; 6,4; 7,0 y 8,0) y concentraciones de CaCl<sub>2</sub> adicionado 2,5; 5 y 7,5 mmol.L<sup>-1</sup>.

En ausencia de CaCl<sub>2</sub> y sin tratamiento con APH se produjo un aumento en la solubilidad proteica en las muestras a pH 6,4 en relación a pH 5,9 ( $p < 0,05$ ) y en las muestras a pH 8,0 en relación a la de pH 7,0 ( $p < 0,05$ ), sin encontrarse diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las de pH 6,4 y 7,0 (Figura I.9). La formación de agregados insolubles causó los bajos valores de solubilidad encontrados en cercanías al punto isoeléctrico de las proteínas de soja: entre 4,5-4,9 para  $\beta$ -conglucina y alrededor de 5,0 para glicina (Koshiyama, 1968; Kella, Barbeau & Kinsella, 1986).

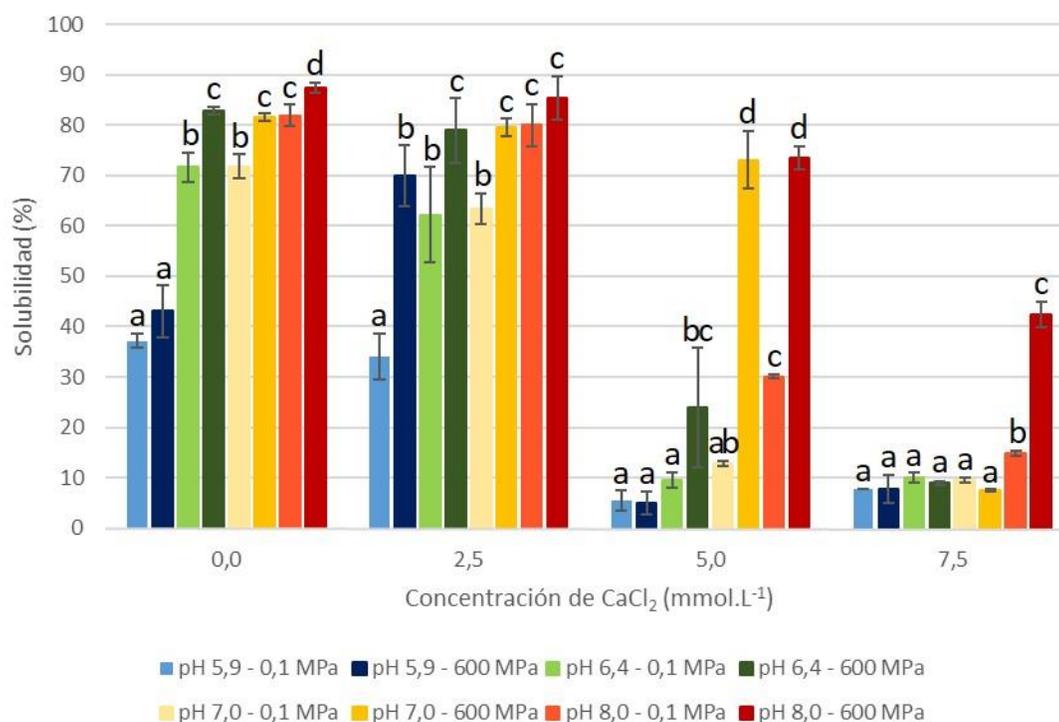


Figura I.9. Solubilidad proteica de dispersiones de APS en función de la concentración de CaCl<sub>2</sub> adicionado, a diferentes valores de pH, antes (0,1 MPa) o después del tratamiento APH (600 MPa-5 min-20 °C). Los valores se expresaron como la media  $\pm$  el desvío estándar. Letras diferentes dentro de una misma concentración de CaCl<sub>2</sub> adicionado indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Cuando la concentración de  $\text{CaCl}_2$  fue  $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  la solubilidad proteica fue mínima a pH 5,9 y aumentó con el aumento de pH. A su vez, cuando la concentración de  $\text{CaCl}_2$  fue de 5 o  $7,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  el mayor valor de solubilidad proteica se encontró a pH 8,0. Este comportamiento podría explicarse teniendo en cuenta la carga superficial que presentan las proteínas de soja. A medida que se incrementa el pH aumentan las cargas negativas sobre las proteínas producto de la disociación de los  $\text{H}^+$  de los ácidos glutámico y aspártico. De esta manera las proteínas pueden unir mayor cantidad de iones calcio sin neutralizar completamente su carga evitando su precipitación. Cuando la concentración de calcio adicionado fue igual o superior a  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  se produjo una importante insolubilización de las proteínas de APS a todos los valores pH ensayados, probablemente producto de la saturación de los sitios de unión al calcio, neutralizando las cargas con la consecuente agregación y precipitación proteica.

El tratamiento con APH produjo un aumento en la solubilidad proteica en las muestras sin adición de calcio cuando el pH fue igual o mayor a 6,4. El incremento relativo (%IS) estuvo comprendido entre un 7 % para las muestras a pH 8,0 y 15 % para las de pH 6,4 (Figura I.9). Torrezan *et al.* (2007) encontraron un incremento del 37 % en la solubilidad de dispersiones acuosas de proteínas de soja ( $20 \text{ g.L}^{-1}$ , pH 6,84) tratadas a 450 MPa durante 20 min, en relación a las muestras sin tratamiento. Lakshmanan, de Lamballerie y Jung (2006) encontraron una disminución de la solubilidad proteica en leches de soja (39 o  $51 \text{ g de proteína.L}^{-1}$ , pH 6,6) luego del tratamiento con APH a 500 o 600 MPa durante 10 min. Todos estos resultados muestran que los efectos producidos por el tratamiento con APH sobre la solubilidad de proteínas de soja dependen fuertemente del valor del pH, de la concentración proteica y de la composición del medio. El incremento de solubilidad en nuestras muestras podría deberse a la ruptura de agregados insolubles transformándolos en solubles o cinéticamente estables, como fue propuesto por Tang y Ma (2009) para dispersiones de proteínas de soja de concentración  $10 \text{ g.L}^{-1}$  a pH 7,0 tratadas a 600 MPa-15 min-25 °C.

En presencia de calcio la magnitud del efecto solubilizante de las APH fue función del pH: a pH 5,9 y  $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  el tratamiento produjo un (IS%) de 105 %, siendo incluso un 88 % más soluble que las muestras sin agregado de calcio tratadas a 600 MPa. La falta de cambios en la solubilidad proteica de las muestras tratadas con APH a pH 5,9 a mayores concentraciones de calcio adicionado sugiere que el efecto observado a  $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  es propio de esa condición y dependiente de la relación calcio/proteína. A pH 6,4 la aplicación de APH

produjo un IS% de 27 % y 151 % a 2,5 y 5 mmol.L<sup>-1</sup> respectivamente, sin cambios significativos a la mayor concentración de calcio adicionado. A pH 7,0 el tratamiento con APH produjo IS% de 25 % y 460 % a 2,5 y 5 mmol.L<sup>-1</sup> respectivamente, mientras que a pH 8,0 el efecto se observó a 5 y 7,5 mmol.L<sup>-1</sup> (IS% de 144 % y 184 %, respectivamente). Estos resultados indican que el rango de concentración de calcio adicionado en el cual se observa el efecto solubilizante de la aplicación de APH depende del pH. Resulta interesante remarcar que las muestras a pH 6,4 y 7,0 presentaron valores de solubilidad similares a 0 y 2,5 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> (antes y después del tratamiento con APH) y a 5 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> a 0,1 MPa, pero con diferencias significativas a 5 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> luego del tratamiento a 600 MPa durante 5 min a 20 °C. Esto sugiere que el pH y la concentración de calcio influyen sobre el efecto que produce el tratamiento con APH sobre la solubilidad proteica. Más aun, es interesante notar que las diferencias en la solubilidad observada entre las muestras a pHs 7,0 y 8,0 a 0,1 MPa fueron canceladas luego del tratamiento con APH a 2,5 y 5 mmol.L<sup>-1</sup> pero no a 7,5 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> (Figura I.9). Esto sugiere que las diferencias en la solubilidad proteica entre las muestras a pHs 7,0 y 8,0 en presencia de calcio dependen de la estructura nativa de las proteínas que posiblemente modulen la afinidad por el mineral. Cuando la estructura proteica fue modificada por el tratamiento con APH, las diferencias observadas fueron canceladas en las muestras que contuvieron una concentración de CaCl<sub>2</sub> hasta 5 mmol.L<sup>-1</sup>.

#### 1.2.4. Efecto del tratamiento con APH sobre el potencial- $\zeta$ de dispersiones de APS adicionadas con CaCl<sub>2</sub> a diferentes valores de pH

El potencial- $\zeta$  es un indicador de la carga superficial de una partícula. Los valores de potencial- $\zeta$  de muestras en las que se observó efecto del tratamiento con APH sobre la solubilidad proteica se muestran en la Tabla I.1.

En las muestras sin adición de calcio y sin tratamiento APH el valor absoluto del potencial- $\zeta$  aumentó en una serie de pasos a medida que el pH se incrementó entre 5,9 y 8,0 (Tabla I.1).

**Tabla I.1. Potencial- $\zeta$  de dispersiones acuosas de APS antes (0,1 MPa) o después del tratamiento con APH (600 MPa-5 min-20 °C).**

pH	Calcio adicionado (mmol.L <sup>-1</sup> )	Presión (MPa)	Potencial- $\zeta$ (mV)
5,9	0	0,1	-25,03 ± 0,01 <sup>b,D</sup>
	2,5	0,1	-18,2 ± 0,2 <sup>a</sup>
	0	600	-25,8 ± 0,4 <sup>b</sup>
	2,5	600	-18,4 ± 0,3 <sup>a</sup>
6,4	0	0,1	-30,5 ± 0,1 <sup>C</sup>
7,0	0	0,1	-33,4 ± 0,1 <sup>c,B</sup>
	5	0,1	-14,7 ± 0,8 <sup>a</sup>
	0	600	-30,7 ± 0,2 <sup>b</sup>
	5	600	-14,0 ± 0,3 <sup>a</sup>
8,0	0	0,1	-35,9 ± 0,9 <sup>c,A</sup>
	7,5	0,1	-12,1 ± 0,1 <sup>a</sup>
	0	600	-31,1 ± 0,8 <sup>b</sup>
	7,5	600	-11,4 ± 0,1 <sup>a</sup>

Los valores se expresaron como la media  $\pm$  desvío estándar. Letras minúsculas diferentes dentro de un mismo valor de pH indican diferencias significativas (test de Tukey,  $p < 0,05$ ). Letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre dispersiones sin agregado de calcio ni tratamiento con APH (0,1 MPa) a diferentes pHs (test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Estos resultados son similares a los reportados por Malhotra y Coupland (2004) quienes determinaron el potencial- $\zeta$  de dispersiones de APS en agua en el rango de pH entre 2,0 y 8,0. En nuestras muestras se observó una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en el potencial- $\zeta$  entre pH 6,4 y 7,0 (Tabla I.1. y Figura I.9.), que no se correspondió con diferencias de solubilidad proteica entre esos valores de pH. Esto indicaría que la solubilidad depende de otros factores además del potencial- $\zeta$ , los cambios de pH modifican, además de la carga superficial, la conformación y/o interacción con el solvente.

La adición de calcio produjo un importante descenso del valor absoluto del potencial- $\zeta$  (Tabla I.1.). La unión de iones calcio a las proteínas de soja es afectada por el pH del medio debido a la competencia entre los H<sup>+</sup> y los iones Ca<sup>+2</sup> por los mismos sitios de unión (Kroll, 1984). Estos iones se unen a través de los grupos carboxilato presentes en los aminoácidos ácidos (pKa aproximado 4) e imidazol de la histidina (pKa aproximado 6). El número de sitios de unión aumenta rápidamente con el incremento del pH entre 3,0 y 6,5 debido a la desprotonación de los ácidos glutámico y aspártico y de la histidina, mientras que a valores

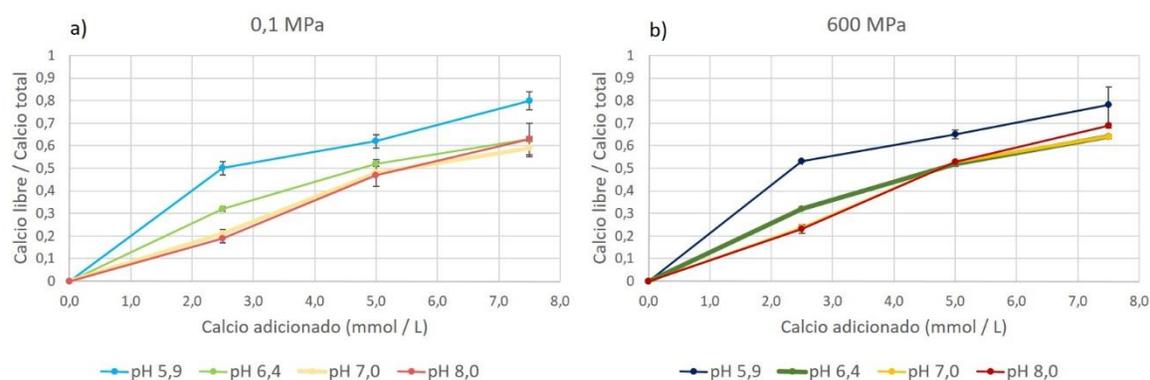
mayores el número de sitios aumenta lentamente con el incremento del pH. La afinidad entre las proteínas de soja y el calcio se incrementa con el aumento del pH hasta un valor de 9,0 (Kroll, 1984). En el ensayo realizado la carga generada por los distintos pHs se compensó con las distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  adicionado. Las diferencias en el potencial- $\zeta$  y en el número de sitios para la unión del calcio entre las dispersiones a pH 7,0 y pH 8,0 son “pequeñas”, sin embargo, las diferencias en solubilidad proteica entre ambos pHs, con o sin adición de calcio, resultaron considerables (Figura I.9.). Las diferencias en afinidad podrían promover la formación de agregados con diferente morfología. Por ejemplo: a una baja afinidad, el calcio podría estar involucrado en la formación de puentes entre dos polipéptidos, incrementando el tamaño de los agregados y produciendo la posterior precipitación. Cuando el calcio se une a proteínas de soja con mayor afinidad, el mineral podría quedar “oculto” en el interior de las mismas o menos accesible, sin posibilidad de formar puentes entre polipéptidos, aumentando de esta manera la solubilidad.

El tratamiento con APH produjo la disminución del valor absoluto del potencial- $\zeta$  en las dispersiones a pH 7,0 y 8,0 sin adición de calcio (Tabla I.1.). Esto podría asociarse a cambios en la estructura de las proteínas de APS inducidos por el tratamiento con APH, que aumentarían la afinidad por los  $\text{H}^+$  o excluirían de la superficie grupos con carga negativa. Por otra parte, no se registraron cambios en los valores de potencial- $\zeta$  en las muestras adicionadas con calcio, después del tratamiento con APH, a ninguno de los valores de pH ensayados. Este último resultado indicaría que la cantidad de calcio unido a las proteínas de soja antes y después del tratamiento con APH es la misma.

#### 1.2.5. Efecto del tratamiento con APH sobre la concentración de calcio libre en dispersiones de APS a diferentes valores de pH

La unión del calcio a las proteínas de soja es afectada por numerosos factores: interacciones de naturaleza coulombica entre el ion calcio y las proteínas y la liberación de moléculas de agua ya sea de las capas de hidratación del ion calcio como la deshidratación del *core* hidrofóbico de las proteínas (Canabady-Rochelle & Mellema, 2010). El pH también es de suma importancia ya que una disminución del mismo produce una reducción en el número de sitios de unión y en la afinidad del calcio por los mismos (Kroll, 1984).

La disociación de los pares iónicos conduce al efecto denominado electroconstricción, que consiste en la contracción del volumen ocupado por las moléculas de solvente debido al alineamiento de las mismas alrededor del campo eléctrico generado por las cargas expuestas. Debido a que la contracción del solvente produce una disminución en el volumen del sistema, es esperable que la presión favorezca la ruptura de las interacciones electrostáticas (Boonyaratanakornkit, Park & Clark, 2002). Más aun, la aplicación de APH produce la disminución reversible del pH (*ca.* 0,5 unidades para 600 MPa a 25 °C) en sistemas acuosos, entre ellos numerosos alimentos líquidos, debido al fenómeno de electroconstricción (Samaranayake & Sastry, 2013) . Teniendo en cuenta lo expuesto y con el objetivo de entender el mecanismo implicado en el efecto solubilizante de los tratamientos con APH, se determinó la concentración de calcio libre en las dispersiones de APS a diferentes valores de pH, antes y después del tratamiento (Figura I.10.).



**Figura I.10.** Fracción de calcio libre en dispersiones acuosas de APS a diferentes valores de pH en función de la concentración de calcio adicionado, antes (0,1 MPa, panel a) o después del tratamiento con APH (600 MPa- 5 min -20 °C, panel b)). Los valores se expresaron como la media  $\pm$  desvío estándar.

Antes del tratamiento con APH (0,1 MPa), para una misma concentración de calcio adicionado, la fracción de calcio libre fue mayor a pH 5,9, seguida por las dispersiones a pH 6,4, mientras que los menores valores se observaron a pH 7,0 y 8,0. Más aun, la fracción de calcio libre aumentó en forma prácticamente lineal con el incremento de la concentración de calcio adicionado, en todos los valores de pH ensayados (Figura I.10., panel a)). Estos resultados coinciden con los encontrados por Kroll (1984), quien informó que los sitios de unión para el ion calcio aumentaban con el pH hasta un valor de 7,0. Luego del tratamiento a 600 MPa durante 5 min a 20 °C no se observaron diferencias significativas con los valores correspondientes de las muestras sin tratamiento (0,1 MPa) (Figura I.10, paneles a) y b)).

Los resultados obtenidos hasta el momento nos permiten hipotetizar que ocurriría una disociación reversible de los iones calcio desde los sitios de unión en la proteína durante el tratamiento con APH. Esta disociación sería promovida por dos efectos inducidos por el tratamiento: la electroconstricción y la disminución del número (y afinidad) de los sitios de unión debido al descenso del pH. Luego de la descompresión, las interacciones electrostáticas promoverían la unión entre el calcio y las proteínas de APS explicando la falta de diferencias en la fracción de calcio libre y el potencial- $\zeta$  luego del tratamiento. La reversibilidad de la disociación/asociación calcio-proteínas puede deberse al bajo número de interacciones (comparado con el alto número de interacciones involucradas en otros procesos irreversibles como la desnaturalización proteica) que se ponen en juego en la unión entre un resto negativo presente en las proteínas de APS y el ion calcio.

Algunos efectos de la aplicación de APH sobre las proteínas son reversibles mientras que otros son irreversibles (Balny & Masson, 1993). A 600 MPa ocurre un desplegamiento en las proteínas de soja que conlleva a un alto e irreversible grado de desnaturalización en el APS (Puppo *et al.* 2004). Sin embargo, nuestra hipótesis es que el efecto de la APH sobre la asociación/disociación de iones calcio (o hidrógeno) con o desde las cargas negativas de las proteínas sería reversible debido al pequeño número de interacciones y desplazamientos involucrados en relación a los que afectan el desplegamiento proteico. Por lo tanto, postulamos que el efecto del tratamiento a 600 MPa podría consistir en una ruptura transitoria de los puentes que genera el calcio con las proteínas de APS, permitiendo la formación de agregados con diferentes estructuras y tamaños una vez que se descomprime. Añón, de Lamballerie y Speroni (2012) informaron la formación de agregados solubles y con un tamaño de exclusión de 0,45  $\mu\text{m}$  a partir de proteínas de soja y calcio tratados a 600 MPa a pH 8,0. Este tipo de agregados solubles o cinéticamente estables podrían también formarse a los valores de pH ensayados en nuestro estudio a partir de la ruptura de agregados de mayor tamaño insolubles inducida por la aplicación de APH. Los resultados de Tang y Ma (2009) y Añón, de Lamballerie y Speroni (2012) indicaron que el tamaño de los agregados es un factor crítico en la solubilidad y estabilidad de dispersiones de proteínas de soja tratadas con APH. El tratamiento con APH redujo el tamaño de los agregados insolubles y grandes para formar otros que fueron solubles y tuvieron tamaños en distintos rangos, algunos por debajo y otros por encima del micrómetro.

**Los resultados mostraron que el tratamiento con APH aumentó la solubilidad proteica en aquellas dispersiones en las que la incorporación de calcio, magnesio o hierro la había disminuido.**

**El incremento del pH produjo un aumento en el rango de concentraciones de calcio en el cual la aplicación de APH tuvo efecto sobre la solubilidad de dispersiones adicionadas con este mineral.**

**Los mecanismos no involucrarían cambios irreversibles en el potencial- $\zeta$  ni en el grado de unión de las proteínas con el calcio.**

#### 1.2.6. Efecto del tratamiento con APH sobre la estabilidad física de dispersiones de APS

La estabilidad física de las dispersiones de APS fue analizada en muestras en las cuales el efecto del tratamiento con APH sobre la solubilidad fue importante. También se analizó una condición particular ( $7,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$ -pH7,0-600 MPa) en la que no se observó efecto del tratamiento con APH sobre la solubilidad, pero sí un incremento notorio de la estabilidad, detectado a simple vista.

La turbidez de ciertos alimentos líquidos se debe a la presencia de agregados insolubles en suspensión. La estabilidad de esta fase dispersa es un atributo de calidad en esos productos, ya que la separación de fases disminuye su atractivo visual.

Como una medida de la turbidez de las dispersiones se determinó el %T a tiempo 0 en todo el largo del tubo (Tabla I.2.).

Tabla I.2. Valores de %T a tiempo 0 y de porcentaje de proteína soluble de las muestras en la que se determinó su estabilidad frente a la sedimentación.

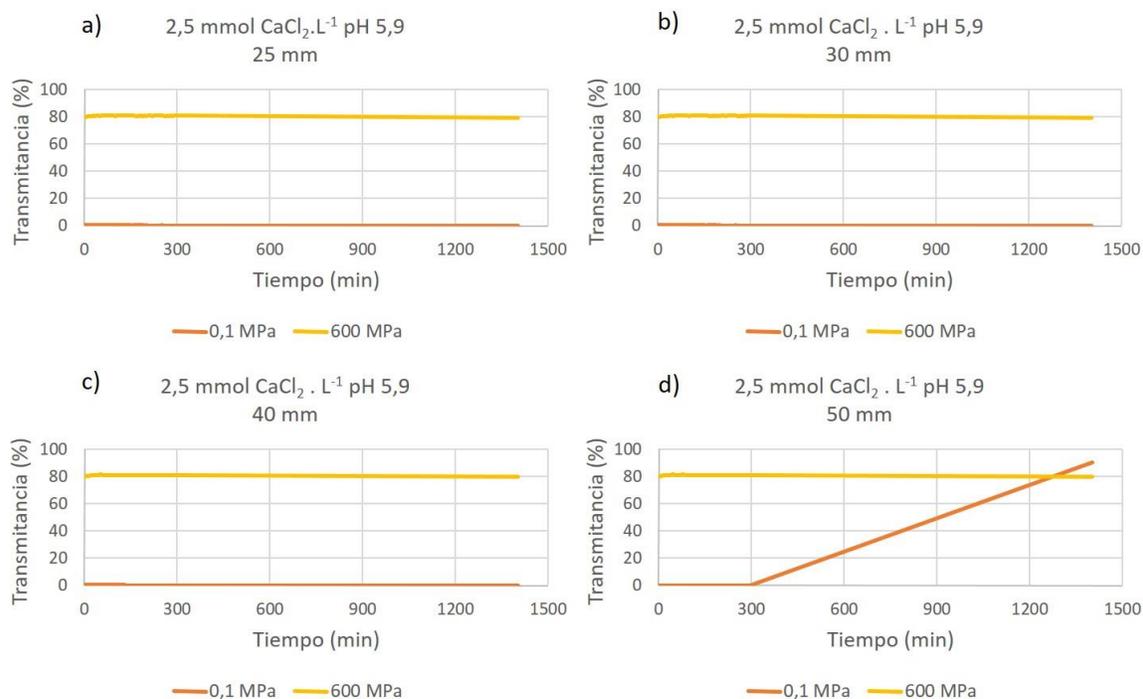
Muestras	Presión (MPa)	%T (Tiempo 0)	Solubilidad (%)
2,5 mmol . L <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> pH 5,9	0,1	0,5 ± 0,0 <sup>a</sup>	34,1 ± 4,5 <sup>a</sup>
	600	79,8 ± 5,0 <sup>b</sup>	70,0 ± 6,0 <sup>b</sup>
5 mmol . L <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> pH 8,0	0,1	0,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	30,1 ± 0,4 <sup>a</sup>
	600	68,3 ± 1,4 <sup>b</sup>	73,5 ± 2,3 <sup>b</sup>
7,5 mmol . L <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> pH 7,0	0,1	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	9,5 ± 0,5 <sup>a</sup>
	600	0,7 ± 0,7 <sup>a</sup>	7,5 ± 0,2 <sup>a</sup>
7,5 mmol . L <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> pH 8,0	0,1	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	14,9 ± 0,5 <sup>a</sup>
	600	41,0 ± 1,2 <sup>b</sup>	42,4 ± 2,5 <sup>b</sup>

Los valores se expresaron como la media ± desvío estándar. Letras diferentes dentro de un mismo tratamiento (sin (0,1 MPa) o con APH (600 MPa – 5min – 20 °C)) indican diferencias significativas (p<0,05). Se presentan los valores de solubilidad (%) mostrados en la Figura I.9. para facilitar la lectura de los resultados. La turbidez se obtuvo a partir del %T a tiempo 0 a lo largo de todo el tubo de medida.

Todas las dispersiones sin tratamiento con APH (0,1 MPa) resultaron turbias, con valores de %T cercanos a cero (Tabla I.2.). Esto se debió a la baja solubilidad de las proteínas de soja presentes en el APS (entre 9,5 y 34,1 %) y/o la presencia de agregados de gran tamaño. Los agregados proteicos normalmente abarcan rangos de tamaño desde los nanómetros hasta los micrómetros, razón por la cual son capaces de dispersar una gran cantidad de luz dentro de la región visible del espectro (Doty & Steiner, 1950).

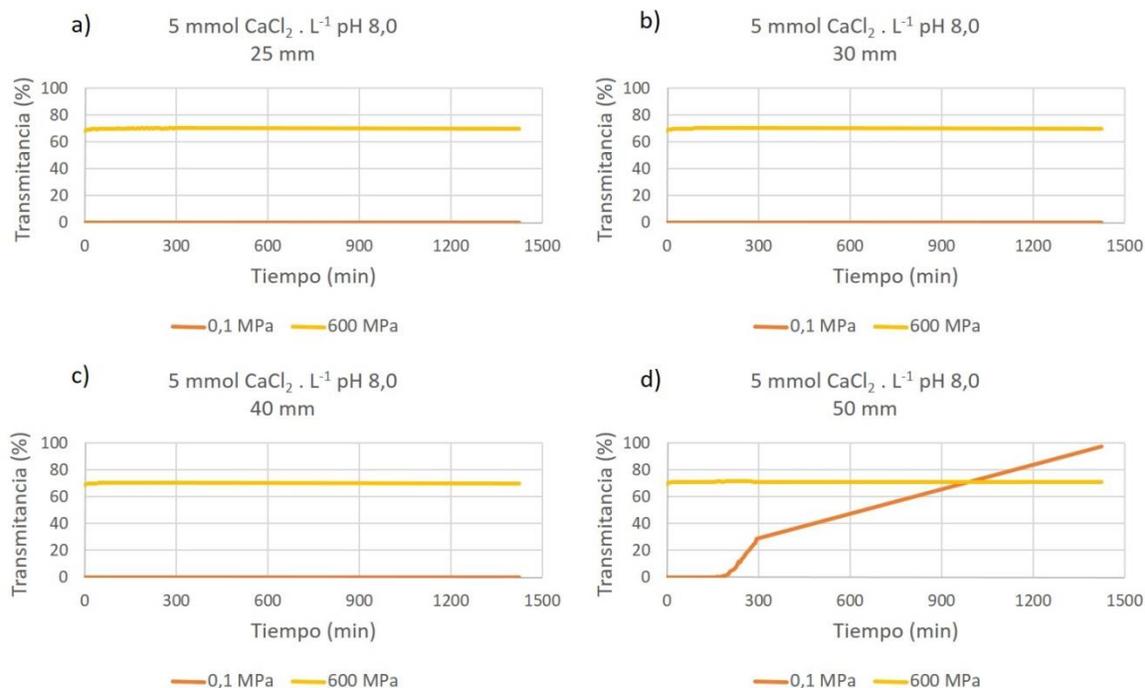
El tratamiento con APH produjo un aumento significativo (p<0,05) en el %T a tiempo 0 de las dispersiones adicionadas con 2,5 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> a pH 5,9; 5 y 7,5 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> a pH 8,0 (Tabla I.2.). Estos cambios podrían deberse al incremento en la solubilidad (Tabla I.2.), que disminuyó la fracción volumétrica de la fase dispersa.

En la Figura I.11. se muestran las cinéticas de %T a 850 nm a 25, 30, 40 y 50 mm de altura tomados desde la base de la celda de vidrio para las dispersiones a pH 5,9 adicionadas con 2,5 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>. Las dispersiones no tratadas con APH no mostraron cambios en el %T durante 5 h. Sin embargo, luego de 24 h el sistema mostró inestabilidad, registrándose un aumento en el %T en la parte superior del tubo (50 mm) debido a sedimentación de agregados, dejando un sobrenadante translucido (%T ca. 90% a las 24 h) (Figura I.11., panel d)). El tratamiento con APH produjo dispersiones estables durante todo el tiempo que duró el ensayo (24 h), sin encontrarse cambios en el %T en ninguna de las partes del tubo utilizado.



**Figura I.11.** Cinéticas de porcentaje de luz transmitida (%T) a 850 nm a 25, 30, 40 y 50 mm de altura (paneles a), b), c) y d), respectivamente) tomados desde la base de la celda de vidrio para las dispersiones 2,5 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> a pH 5,9 sin tratamiento (0,1 MPa) o tratadas con APH (600 MPa – 5 min – 20 °C).

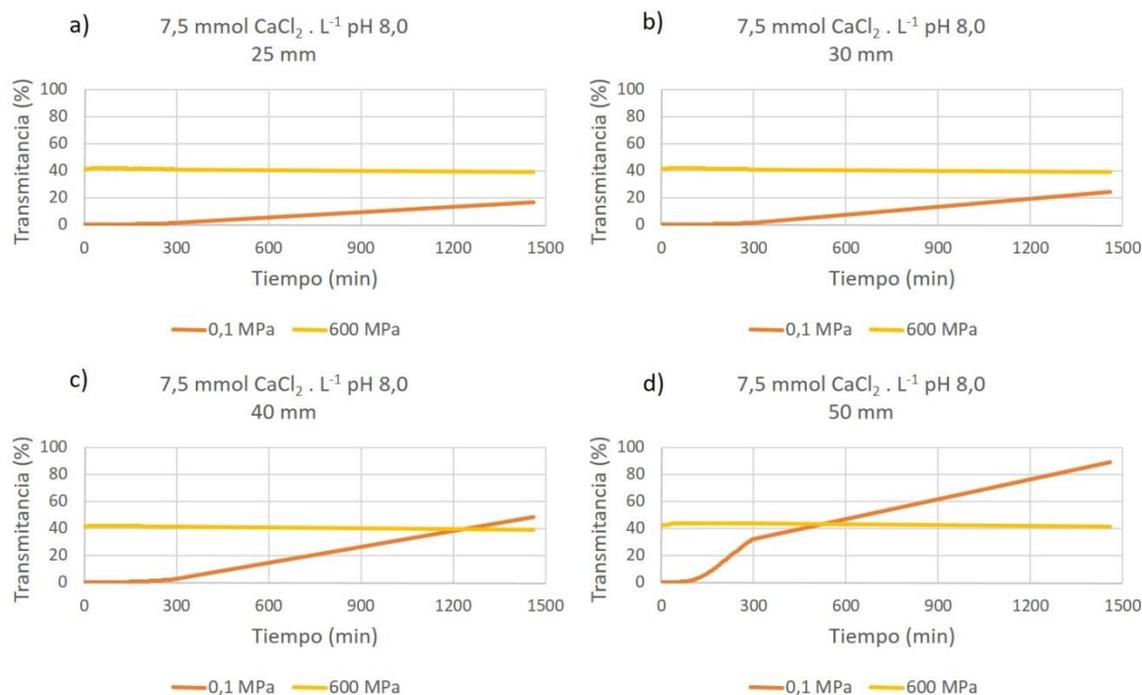
En la Figura I.12. se muestran las cinéticas de %T a 850 nm a 25, 30, 40 y 50 mm de altura tomados desde la base de la celda de vidrio para las dispersiones a pH 8,0 adicionadas con 5 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>. Estas dispersiones exhibieron un %T 0,1 % a tiempo 0 (Tabla I.2.) que se mantuvo constante hasta los 40 mm de altura del tubo (Figura I.12., panel c)). Sin embargo, en la parte más alta del mismo (50 mm) a partir de los 200 min comenzó a aumentar la transmitancia hasta generar un sobrenadante prácticamente transparente (ca. 100 %T) luego de 24 h (Figura I.12., panel d)). El tratamiento de estas dispersiones con APH mejoró su estabilidad; no se registraron cambios en el %T en ninguna de las zonas ensayadas, durante todo el tiempo que duró el análisis (24 h).



**Figura I.12.** Cinéticas de porcentaje de luz transmitida (%T) a 850 nm a 25, 30, 40 y 50 mm de altura (paneles a), b), c) y d), respectivamente) tomados desde la base de la celda de vidrio para las dispersiones 5 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> a pH 8,0 sin tratamiento (0,1 MPa) o tratadas con APH (600 MPa – 5 min – 20 °C).

El aumento de la concentración de calcio adicionado a las dispersiones de APS a pH 8,0 sin tratamiento con APH (muestras 7,5 mmol CaCl<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>-pH 8,0-0,1 MPa; Figura I.13.) generó una dispersión más inestable, encontrándose aumentos en el %T luego de 5 h a los 25, 30 y 40 mm de longitud (Figura I.13., paneles a), b) y c)), y a partir de 100 min en la parte superior del tubo (50 mm) (Figura I.13., panel d)).

Luego del tratamiento con APH, la dispersión de APS adicionada con 7,5 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> a pH 8,0 resultó igual de estable que la adicionada con 5 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> al mismo valor de pH, pero con menor %T en las muestras con mayor concentración de calcio, debido a la menor solubilidad proteica (Tabla I.2. y Figura I.13.).



**Figura I.13.** Cinéticas de porcentaje de luz transmitida (%T) a 850 nm a 25, 30, 40 y 50 mm de altura (paneles a), b), c) y d), respectivamente) tomados desde la base de la celda de vidrio para las dispersiones  $7,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  a pH 8,0 sin tratamiento (0,1 MPa) o tratadas con APH (600 MPa – 5 min –  $20^\circ\text{C}$ ).

Las dispersiones adicionadas con  $7,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  a pH 7,0 sin tratamiento con APH (0,1 MPa) resultaron sumamente inestables. A lo largo de todo el tubo ensayado se observó un rápido aumento en el %T (0 a 80 %, en promedio, en 5 h), comenzando casi en forma instantánea en la parte superior del tubo (50 mm) (Figura I.14., panel d)) y a los 50 min en la zona media del tubo (25 mm) (Figura I.14., panel a)). Estas muestras resultaron más inestables que las preparadas a pH 8,0 a igual concentración de calcio (Figura I.13. *vs.* Figura I.14.). El tratamiento con APH mejoró notablemente la estabilidad de las dispersiones, no registrándose cambios en el %T, que fue nulo durante todo el tiempo que duró el ensayo en todas las zonas del tubo (Figura I.14.). Cabe resaltar que el tratamiento con APH de estas dispersiones no incrementó el porcentaje de proteína soluble, los valores de solubilidad fueron menores al 10 % antes y después del tratamiento con APH (Tabla I.2.). Estos resultados sugieren que el pH afectaría la estructura, tamaño o densidad de los agregados formados por la aplicación de APH, obteniendo un sistema con la mayor parte de las proteínas involucradas en especies insolubles que se repelen entre sí (pH 7,0) o con proporciones similares de agregados solubles e

insolubles (pH 8,0, con el 42,4 % de la proteína soluble) a la misma concentración de calcio adicionado ( $7,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ).

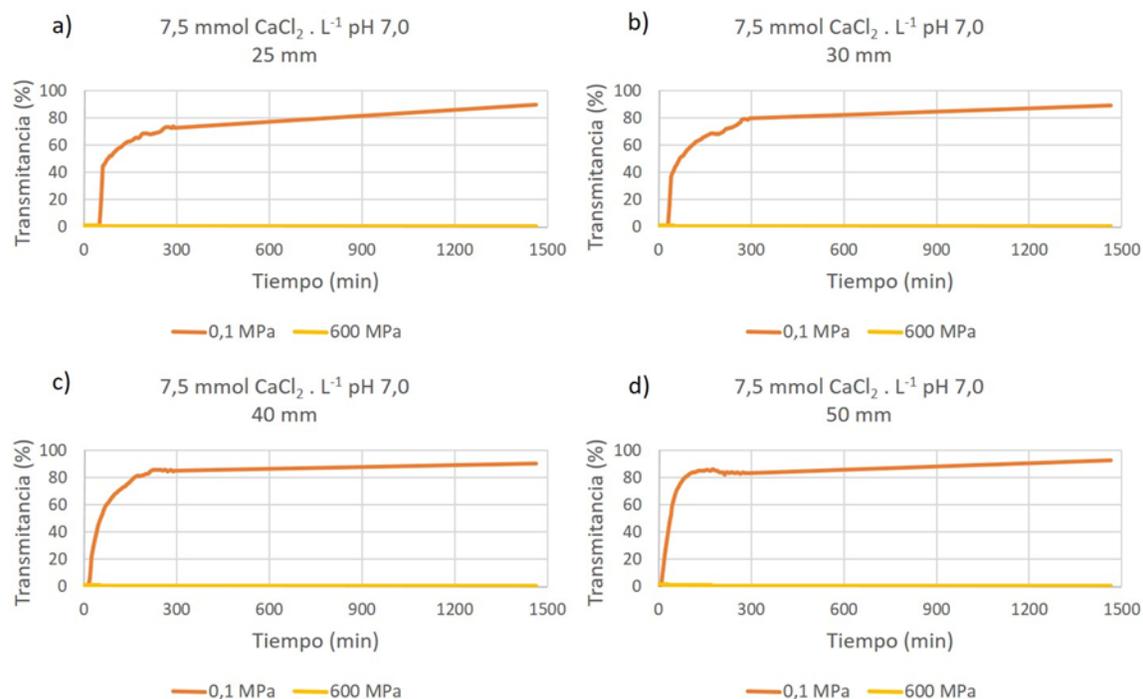


Figura I.14. Cinéticas de porcentaje de luz transmitida (%T) a 850 nm a 25, 30, 40 y 50 mm de altura (paneles a), b), c) y d), respectivamente) tomados desde la base de la celda de vidrio para las dispersiones  $7,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  a pH 7,0 sin tratamiento (0,1 MPa) o tratadas con APH (600 MPa – 5 min –  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Molina y Wagner (1999) propusieron que el aumento de la hidratación disminuía la diferencia entre la densidad de los agregados y del medio dispersante, generando una caída en la velocidad de sedimentación. Posiblemente, el tratamiento con APH incrementó la hidratación de las proteínas presentes en las dispersiones adicionadas o no adicionadas con calcio. Este aumento de hidratación podría ser una de las causas del aumento de la solubilidad y de la estabilidad de las mismas. Huppertz, Fox y Kelly (2004) estudiaron los efectos de APH sobre la estabilidad y solubilidad de proteínas de leche, encontraron que luego del tratamiento las micelas presentaban una mayor hidratación y propusieron que en parte este fenómeno podía deberse a la interacción entre proteínas solubles ( $\beta$ -lactoglobulina) con las caseínas. La solubilización de las caseínas sería consecuencia de la solubilización del fosfato de calcio coloidal. De esta forma los autores concluyeron que el tratamiento afectó tanto a las proteínas solubles como a las insolubles.

La estabilidad de las dispersiones sin tratamiento con APH mostró un comportamiento dependiente de la concentración de calcio y de los valores de pH estudiados. Comparando las muestras a pH 8,0 con 5,0 y 7,5 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> se observó que la mayor concentración de calcio favoreció la sedimentación. Nuestros resultados indican que el tratamiento con APH generó dispersiones coloidalmente estables (al menos durante 24 h) en las 4 muestras estudiadas. De esta manera sería posible la obtención de dispersiones proteicas con diferentes valores de solubilidad, estabilidad de agregados insolubles y turbidez, combinando factores como el pH, concentración de calcio y tratamiento con APH. Estas características podrían resultar muy útiles en el desarrollo de alimentos líquidos preparados en base a proteína de soja.

**Los tratamientos con APH mejoraron la estabilidad coloidal de dispersiones adicionadas con calcio. En los casos en que el tratamiento aumentó la solubilidad, la turbidez se redujo, por lo que se generaron dispersiones menos turbias y estables.**

### 1.3. Conclusiones del Capítulo I

Los tratamientos con APH ejercieron un efecto solubilizante y un efecto estabilizante sobre dispersiones de APS adicionadas con calcio. Estos efectos sobre los agregados insolubles tendrían cierto grado de independencia entre sí y podrían ser aprovechados para la preparación de distintos alimentos líquidos.

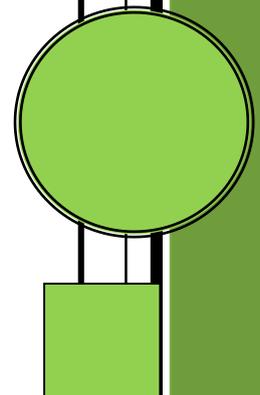
Fenómenos como cambios estructurales, disociación reversible de la unión calcio-proteína durante el tratamiento con APH, disociación de agregados y/o aumento en la interacción con el solvente podrían estar involucrados en los mecanismos de solubilización y estabilización.

Tanto el pH como la concentración de calcio modularon los efectos de los tratamientos con APH

## Capítulo II

Caracterización fisicoquímica de dispersiones de APS en *buffers* adicionadas con calcio a distintos valores de pH.

Estudio de emulsiones o/w obtenidas a partir de dichas dispersiones.



## 2.1. Introducción

### 2.1.1. Fenómenos de superficie

Una interfase es una delgada región que separa dos fases, las cuales pueden ser gas-líquido, gas-sólido, líquido-líquido, líquido-sólido o sólido-sólido (Walstra, 2003a). Por convención, la región que separa dos fases condensadas (sólido o líquido) recibe el nombre de interfase, mientras que la región que separa una fase condensada de un gas recibe el nombre de superficie (Everrett, 1988). Si se considera una interfase establecida entre agua y aceite, la interacción de las moléculas de ambas especies en la misma es termodinámicamente desfavorable debido a la tendencia que presenta el sistema en reducir el contacto entre los grupos no polares y el agua, disminuyendo de esta manera su energía libre. Para aumentar el área de contacto entre las fases agua y aceite es necesario entregarle al sistema una cierta cantidad de energía proporcional al aumento de área (Hiemenz & Rajagopalan, 1997):

$$\Delta G = \gamma_i \Delta A$$

donde  $\Delta G$  es la energía libre necesaria (a temperatura y presión constante) para incrementar el área de contacto en un valor  $\Delta A$  y  $\gamma_i$  es la constante de proporcionalidad denominada tensión interfacial (tensión superficial,  $\gamma_s$ , en el caso en que una de las fases sea gaseosa). El valor de la tensión interfacial está determinado por la magnitud del desbalance de las interacciones moleculares a lo largo de la interfase: cuanto mayor sea el desbalance mayor el valor de la tensión interfacial (Israelachvili, 1992; Evans & Wennerstrom, 1994). La tensión interfacial actúa en la dirección de la interfase y se opone al crecimiento de ésta, propiedad en la que se basan los métodos que pueden medirla (Walstra, 2000). Puede ser expresada en términos de energía por unidad de área interfacial ( $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ ) o en unidades de fuerza por unidad de longitud de interfase ( $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ ). En la Tabla II.1. se muestran valores típicos aproximados de tensiones interfaciales a temperatura ambiente.

**Tabla II.1. Valores de tensión interfacial aproximados medidos a temperatura ambiente. Adaptado y traducido de McClements (2005).**

Muestras	$\gamma_i$ (mN.m <sup>-1</sup> ) frente al aire
Agua	72
Solución de SDS*	37
Dispersión proteica*	50
Etanol	22

**\*) Valores medidos en condiciones de saturación de la interfase.**

Hay sustancias que disminuyen el valor de  $\gamma$  adsorbiéndose y acomodándose en la interfase. Estas sustancias reciben el nombre de tensioactivos, y de sus propiedades depende en que cantidad y como se adsorban a la interfase. El descenso de  $\gamma$  se suele expresar en términos de la presión interfacial ( $\pi$ ):

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

donde  $\gamma_0$  es la tensión interfacial del solvente puro y  $\gamma$  el valor de la tensión interfacial en presencia del tensioactivo.

#### 2.1.1.1. Moléculas tensioactivas en la interfase

Los tensioactivos constan de una o más zonas que tienen afinidad por la fase polar (habitualmente agua) y una o más zonas que tienen afinidad por la fase no polar (normalmente aceite en una emulsión). Las proteínas suelen ser los agentes tensioactivos de elección en la industria alimentaria, especialmente para la formación de emulsiones aceite en agua (o/w) (sección 2.1.2.) (Walstra & De Roos, 1983). La velocidad con la que una proteína se adsorbe en una interfase depende de varios factores importantes que determinan su eficacia como emulsificante (Walstra & Smulders, 1998), tales como tamaño, flexibilidad, conformación e interacciones entre las moléculas, así como de la naturaleza de la fase continua (viscosidad, polaridad) y de factores tales como la temperatura y los mecanismos de transferencia de masa involucrados (McClements, 2005). Una vez que las proteínas se adsorben su conformación puede cambiar considerablemente en la interfase, formando trenes, *loops* o colas (Figura II.1.). Esos cambios conformacionales pueden ser considerados como una forma de desnaturalización. A su vez, tratamientos que produzcan la desnaturalización proteica, como por ejemplo las APH, son capaces de inducir comportamientos interfaciales diferentes

(Galazka *et al.* 1995; Galazka, Dickinson & Ledward, 1996). La mayoría de las proteínas globulares parecen retener en la interfase una conformación aproximadamente globular, aunque no la nativa, mientras que proteínas con escaso contenido de estructura y con mayor flexibilidad, como la caseína, tienden a adsorberse como un polímero lineal. Estas proteínas flexibles cambian la conformación más fácilmente que las proteínas globulares como las proteínas mayoritarias de los aislados proteicos de soja.

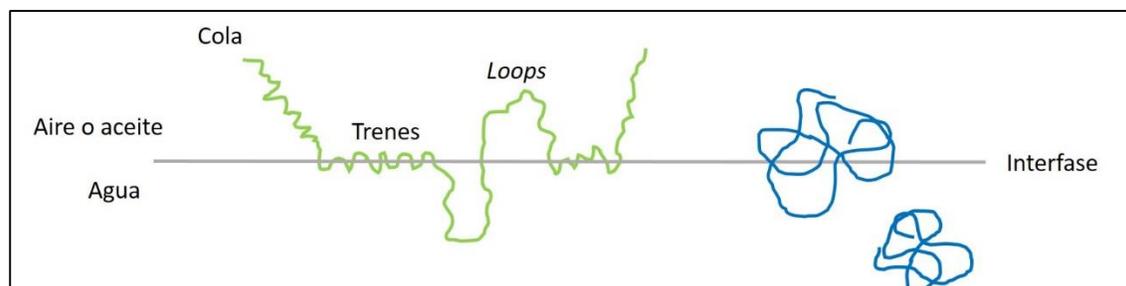


Figura II.1. Esquema de adsorción y reordenamiento de proteínas flexibles (verde) o globulares (azul). Traducido y adaptado de Bos y van Vliet (2001) y McClements (2005).

Por otra parte, entre las proteínas de la interfase pueden establecerse reacciones de entrecruzamiento mediante interacciones electrostáticas, hidrofóbicas o covalentes (formación de puentes disulfuro) (Dickinson & Matsumura, 1991). De esta manera, la adsorción de una proteína en la interfase podría ser considerada irreversible en ausencia de otras proteínas con mayor flexibilidad o de pequeñas moléculas tensioactivas, comúnmente llamados surfactantes, que muestran mayor actividad tensioactiva y producen mayores disminuciones de la presión superficial. En la práctica, la capa adsorbida es dominada por la proteína que se adsorbió primero en la interfase (Mackie *et al.* 2001).

#### 2.1.1.2. Cinética de adsorción de una proteína

Cuando se añade una sustancia con actividad superficial en un líquido ésta se adsorbe espontáneamente en la superficie y disminuye la energía superficial (de no ser así no sería espontánea su adsorción) (Adamson, 1976). Por definición, se mide la tensión superficial en una interfase gas-líquido (por ejemplo, aire-agua) o la tensión interfacial en una interfase líquido-líquido (por ejemplo, aceite-agua). Estas medidas en función del tiempo se conocen como cinéticas de adsorción y los equipos utilizados para tal fin se conocen como tensiómetros (Couper, 1993).

Para el caso de una proteína, luego de su llegada a la interfase, ocurrirá su reorganización. Este proceso, en general, consume mayor tiempo para las proteínas globulares dado que su desplegamiento parcial requiere mayor energía de activación. A su vez, el grado de empaquetamiento de las moléculas en la interfase tiene una considerable influencia en la magnitud del cambio de conformación (Dickinson, 1999). Cuanto menor sea la cantidad de moléculas adsorbidas mayor será el espacio disponible en la interfase para que la proteína puede extenderse y aumentar sus estados de desnaturalización. Las proteínas que se adsorben en primera instancia generalmente presentan mayor grado de desplegamiento y suelen intercambiarse muy poco con el seno de la solución. A tiempos mayores se verán favorecidas las interacciones atractivas y enlaces cruzados entre las moléculas proteicas, lo que se refleja en un aumento gradual de la irreversibilidad de la adsorción (van Aken, Blijdenstein & Hotrum, 2003). Las moléculas de proteína que se adsorben más tarde pueden participar en la formación de multicapas menos retenidas, pudiendo generar comportamientos mecánicos particulares en la interfase (Li, Zhang & Yan, 2001).

#### 2.1.1.3. Reología interfacial: deformaciones interfaciales dilatacionales

Las propiedades reológicas de una interfase influyen en la formación, estabilidad y textura de las emulsiones alimentarias, por lo cual es importante establecer los factores que la afectan (Bos & van Vliet, 2001). Cuando una emulsión es sometida a agitación mecánica la interfase de las gotas experimenta una serie de deformaciones como resultado de las tensiones que actúan sobre ellas (Walstra, 2003a). Estas tensiones pueden causar, por ejemplo, que el área interfacial se expanda o se contraiga, fenómeno conocido como deformación interfacial dilatacional. Una interfase con comportamiento tipo sólido quedará descrita por una constante interfacial elástica, mientras que para un comportamiento tipo líquido quedará descrita por una constante interfacial viscosa. En la práctica muchas interfaces presentan un comportamiento intermedio que recibe el nombre de comportamiento viscoelástico (McClements, 2005).

La reología dilatacional está basada en la aplicación de cambios en el área interfacial y en la medición continua de la tensión interfacial. Existen varios métodos para medirla, como la balanza de Langmuir o los tensiómetros de gota pendiente o montante (Benjamins, Cagna & Lucassen-Reynders, 1996; McClements, 2005). En los estudios con proteínas la interpretación de los datos de reología interfacial dilatacional depende de la escala de tiempo en las

velocidades de dilatación-compresión y de las frecuencias de deformación utilizadas (Bos & van Vliet, 2001). A su vez, el comportamiento reológico del film interfacial depende de factores como la temperatura, pH, fuerza iónica y concentración de proteína adsorbida. Burgess y Sahin (1997) observaron una disminución en la elasticidad de las interfases cuando los valores de pH utilizados eran cercanos al punto isoeléctrico de las especies proteicas involucradas, mientras que registraron aumentos en la elasticidad de la misma con el aumento de la fuerza iónica o con la concentración de la proteína interfacial.

Cabe mencionar que las medidas de reología interfacial se hacen sobre superficies macroscópicas y los rangos de tensiones y deformaciones aplicadas en las superficies o interfaces no reflejan las condiciones prácticas de la formación y comportamiento de las emulsiones. Esto significa que probablemente no exista una relación directa entre la reología interfacial y la formación y/o estabilidad de una emulsión (Bos & van Vliet, 2001). Muchas teorías describen la coalescencia como la formación de un hueco en el film interfacial (de Vries, 1958; Vrij, 1970) el cual depende, entre otros factores, de su espesor. A su vez, se cree que la elasticidad y la viscosidad interfacial son importantes para explicar la ruptura del film que va a formar el hueco y que contribuye al proceso de coalescencia. Existe evidencia experimental que demuestra relaciones entre la reología interfacial de films de  $\beta$ -lactoglobulina en la interfase o/w y la estabilidad de emulsiones estabilizadas por la misma proteína. También se observó que el entrecruzamiento producido por enzimas como la transglutaminasa aumenta la estabilidad de emulsiones estabilizadas por proteínas (Faergemand, Murray & Dickinson, 1997). Resulta difícil encontrar una teoría que relacione directamente las propiedades reológicas y las interfaciales con la estabilidad de una emulsión. Existen muchas ideas e hipótesis basadas en evidencias circunstanciales fuertemente dependientes de las características y composición de los sistemas estudiados (Bos & van Vliet, 2001).

### 2.1.2. Emulsiones

Una emulsión está formada por dos líquidos inmiscibles (comúnmente aceite y agua), donde uno de ellos se encuentra disperso en forma de pequeñas gotas (fase interna o dispersa) dentro del otro (fase externa o continua) (Robins, Watson & Wilde, 2002). Un sistema que consiste en gotas de aceite dispersas en una fase acuosa recibe el nombre de emulsión aceite en agua (o/w, del inglés *oil-in-water*), como por ejemplo la mayonesa, la leche, la crema, entre otras. La proporción de gotas de aceite en una emulsión normalmente se informa como la fracción

volumétrica de fase dispersa ( $\Phi$ ), la cual es igual al volumen total de las gotas ( $V_g$ ) dividido por el volumen total de la emulsión ( $V_e$ ). El valor de  $\Phi$  es importante ya que influye sobre la apariencia, textura, *flavor*, estabilidad y costo de los productos alimenticios en base a emulsiones.

Es posible formar una emulsión a través de la homogeneización de aceite y agua en estado puro. Sin embargo, rápidamente el sistema sufrirá la separación de las fases, formándose una capa de aceite en la parte superior del mismo producto de su menor densidad. Esto se debe a que el contacto entre moléculas de agua y aceite es energéticamente desfavorable (Israelachvili, 1992), convirtiendo a las emulsiones en sistemas termodinámicamente inestables. La inestabilidad se debe a la gran cantidad de área interfacial creada, sumado a una alta tensión interfacial, lo que genera un aumento en la energía libre del sistema (Wagner, 2000). Por definición, la variación de energía libre ( $\Delta G$ ) asociada a la formación de una emulsión viene dada por:

$$\Delta G_{\text{form}} = \gamma \Delta A - T \Delta S_{\text{form}}$$

en donde  $\gamma$  es la tensión interfacial,  $T$  es la temperatura absoluta y  $\Delta S$  es el cambio de entropía. En la mayoría de las emulsiones alimentarias en donde el tamaño de gota se encuentra entre 0,1 y 100  $\mu\text{m}$  (Dickinson & Stainsby, 1982; Walstra, 1996a,b) el término ( $-T \Delta S_{\text{form}}$ ) puede ser despreciado (Hunter, 1989).

Para lograr que una emulsión sea estable en el tiempo es necesaria la incorporación de agentes emulsificantes y/o espesantes antes de realizar la homogeneización. Los emulsificantes son moléculas anfifílicas (presentan regiones hidrofóbicas e hidrofílicas) tensioactivas capaces de adsorberse en la interfase de las gotas producidas durante la homogeneización, evitando que las mismas se acerquen lo suficiente para unirse. Las proteínas representan al tipo de molécula más utilizado en la industria alimentaria como agente emulsificante. Las proteínas desempeñan dos funciones importantes a la hora de estabilizar las emulsiones: disminuyen  $\gamma$  durante el proceso de emulsificación al adsorberse a la interfase creada, y forman una capa macromolecular en la superficie de las gotas evitando o retardando la ocurrencia de ciertos fenómenos asociados a la desestabilización de la emulsión (Walstra, 1983, 2003b). Por otra parte, los agentes espesantes, mayormente polisacáridos, se suelen agregar a la fase continua de manera de aumentar su viscosidad, retardando el movimiento de las gotas.

### 2.1.2.1. Formación de la emulsión

Para producir una emulsión se necesita aceite, agua, emulsificante y energía. Formar las gotas es sencillo, disminuir su tamaño es difícil. El tamaño de las gotas producidas por un homogeneizador depende del balance entre dos procesos opuestos: la ruptura y la reformación de gotas grandes a partir de otras de menor tamaño, fenómeno conocido como coalescencia. La ruptura de las gotas depende del balance entre las fuerzas interfaciales que tienden a mantenerlas juntas y las fuerzas disruptivas, generadas por el homogeneizador, que tienden a separarlas (Walstra, 1983). Una gota de aceite tiende a mantener su forma esférica ya que minimiza el contacto energéticamente desfavorable con el medio acuoso. La fuerza interfacial responsable en el mantenimiento de la forma esférica característica viene dada por la presión de Laplace ( $\Delta P_L$ ),

$$\Delta P_L = 4 \gamma / d$$

en donde  $d$  representa el diámetro de la gota. Debido a que la presión actúa a través de la interface aceite/agua hacia el centro de la gota la presión es mayor en el interior de la misma. De esta manera, para deformar y/o romper una gota durante el proceso de homogeneización es necesaria la aplicación de una fuerza externa significativamente mayor que la fuerza interfacial (Walstra, 1983). A medida que se reduce el tamaño de las gotas aumenta la presión de Laplace, generando una mayor resistencia de las mismas a las deformaciones. Una forma de disminuir la energía necesaria en este proceso es disminuyendo la tensión interfacial mediante el agregado de un agente emulsificante. Por su parte, las fuerzas disruptivas que actúan sobre una gota durante la homogeneización dependen de las condiciones de flujo utilizadas en los distintos homogeneizadores existentes. Entre ellos se encuentran (Figura II.2.):

- Agitadores rotatorios de alta velocidad
- Molinos coloidales
- Homogeneizadores a válvula por alta presión
- Homogeneizadores por ultra sonido
- Microfluidizadores
- Homogeneizadores de membrana

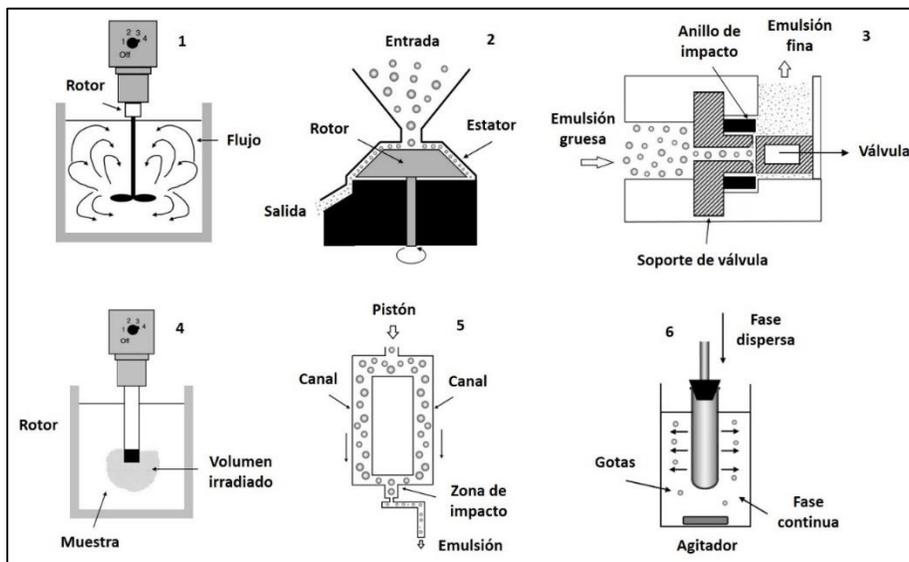


Figura II.2. Esquema de diferentes homogenizadores utilizados en la obtención de emulsiones. 1) Agitador rotatorio de alta velocidad, 2) Molino coloidal, 3) Homogenizador a válvula, 4) Homogenizador por ultra sonido, 5) Microfluidizador, 6) Homogenizador de membrana. Traducido de McClements (2005).

Las colisiones entre gotas son particularmente rápidas durante la homogeneización debido a la intensa agitación mecánica producida por el homogeneizador. Si las gotas no se encuentran protegidas por una membrana resistente tenderán a coalescer unas con otras luego de la colisión (Walstra, 1993). Para evitar este fenómeno es de vital importancia que el agente emulsificante se adsorba rápidamente en la nueva interfase creada (Figura II.3).

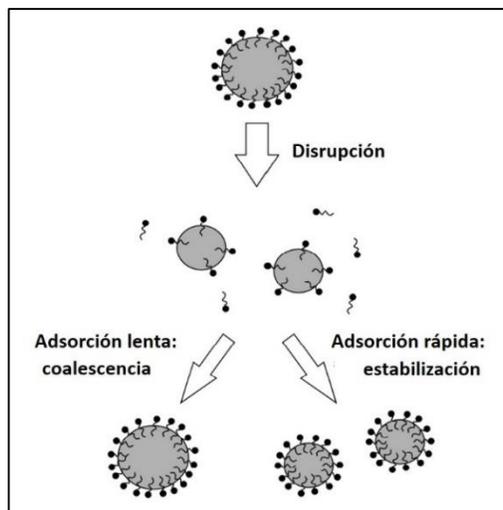


Figura II.3. El tamaño de las gotas producidas durante la homogeneización depende de la velocidad de adsorción del emulsificante y del tiempo entre colisiones. Traducido de McClements (2005).

### 2.1.2.2. Maduración de la interfase

Luego de la adsorción de la proteína en la interfase la molécula tenderá a adoptar una conformación en la cual los grupos no polares se localicen hacia la fase lipídica y los grupos polares hacia la fase acuosa, disminuyendo de esta manera su energía libre. Esta conformación, y por consiguiente las propiedades fisicoquímicas de la membrana formada, dependerán de la estructura molecular y de las interacciones que puedan formarse. El tiempo que le lleve a la proteína modificar su conformación en la interfase dependerá de la estructura propia de la molécula y de su flexibilidad (Freer *et al.* 2004). Las proteínas globulares, tardarán más tiempo en reordenarse que aquellas con una estructura relativamente más flexible.

El desplegamiento de proteínas globulares en la interfase podría generar la exposición de aminoácidos que normalmente se encuentran localizados hacia el interior hidrofóbico de la molécula aumentando la probabilidad de generar interacciones con otras moléculas de proteínas vía atracciones hidrofóbicas o mediante la formación de puentes disulfuro (Dickinson & Matsumura, 1991). De esta manera, las proteínas globulares tienden a formar membranas relativamente delgadas, compactas y con alta viscoelasticidad (Dickinson, 1992). Ciertas características de estas membranas, como son su espesor, carga eléctrica, grado de empaquetamiento de las moléculas y/o exposición de grupos reactivos, así como las condiciones del medio tales como pH, fuerza iónica y temperatura son determinantes a la hora de analizar la estabilidad del sistema. Por ejemplo, cerca del punto isoeléctrico, las proteínas globulares son capaces de adsorberse rápidamente en la interfase aceite/agua y formar membranas viscoelásticas gruesas, pero dichas emulsiones no serán muy estables debido a que la repulsión electrostática entre las gotas es insuficiente para prevenir su agregación (McClements, 2005).

### 2.1.2.3. Desestabilización de las emulsiones

Las emulsiones pueden desestabilizarse por diferentes mecanismos que pueden involucrar cambios en la posición o distribución de las gotas en el espacio (cremado, floculación) o por cambios en su tamaño (coalescencia) (Figura II.4.). A su vez, estos procesos pueden relacionarse: por ejemplo, la floculación afecta el cremado y puede favorecer la coalescencia.

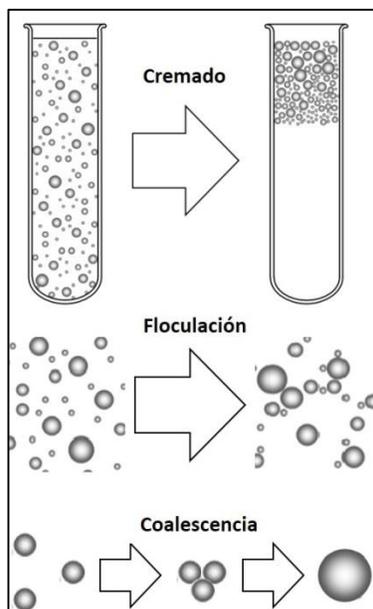


Figura II.4. Esquema de mecanismos de desestabilización en emulsiones o/w

#### 2.1.2.3.1. Cremado

El cremado (en emulsiones o/w) es el movimiento ascendente de gotas lipídicas producto de la diferencia en la densidad ( $\rho$ ) entre la fase continua y la dispersa. La velocidad de cremado puede aproximarse con algunas limitaciones por la ley de Stokes, que resulta del balance entre la fuerza gravitacional ascendente y la fuerza de fricción descendente que operan sobre una partícula esférica aislada:

$$v_{\text{Stokes}} = \frac{2gr^2(\rho_d - \rho_c)}{9\eta_c}$$

donde los subíndices d y c corresponden a la fase dispersa y continua, respectivamente, g es la aceleración de la gravedad, r es el radio de la partícula y  $\eta$  la viscosidad. De la ecuación se desprende que la velocidad de cremado depende fuertemente del tamaño de las gotas: cuanto mayor sea éste más rápido será el cremado. Sin embargo, no debe perderse de vista que la ley de Stokes responde al comportamiento de una partícula esférica aislada dispersa en un líquido ideal. En los sistemas alimentarios existen numerosas desviaciones al comportamiento predicho producto de la concentración y distribución de tamaños de gota, carga eléctrica y espesor de la membrana formada en la interfase, interacción entre gotas, etc. Para evitar o disminuir el cremado se puede disminuir la diferencia de densidades entre la fase dispersa y la

continua, reducir el tamaño de gota, aumentar la viscosidad de la fase continua y/o aumentar la concentración de la fase dispersa ( $\Phi$ ) (McClements, 2005).

#### 2.1.2.3.2. Floculación

Es el proceso por el cual dos o más gotas se asocian para formar un agregado en el cual cada una de las mismas mantiene su integridad individual. Este proceso puede ser ventajoso o perjudicial en función del tipo de sistema que se quiera obtener. La floculación acelera la velocidad de cremado en emulsiones diluidas, situación desfavorable ya que reduce su vida útil (Luyten *et al.* 1993; Tan, 2004). En otros casos provoca un aumento pronunciado en la viscosidad de la emulsión, pudiendo incluso formar un gel (Demetriades, Coupland & McClements, 1997). Algunos productos alimenticios buscan tener baja viscosidad, con lo cual la floculación es un fenómeno no deseado. En otros, una floculación controlada resulta ventajosa ya que le aporta al producto una textura deseable.

La velocidad con la que ocurre la floculación depende de dos factores: la frecuencia de colisión entre las gotas y la fracción de las mismas que conduzcan a la agregación. La colisión entre gotas ocurre como resultado de su desplazamiento, el cual puede ser inducido por el movimiento Browniano, la acción de la gravedad o por la aplicación de fuerzas mecánicas durante la etapa de homogeneización. A su vez, la eficiencia de la colisión, es decir el número de colisiones que conducen a la floculación, dependerá de la energía de los choques. Si es lo suficientemente alta como para vencer la energía de repulsión que tiende a mantener las gotas alejadas unas con otras se producirá la agregación de las mismas.

Los métodos para controlar la floculación se basan en bajar la frecuencia de las colisiones, (por ejemplo, aumentando la viscosidad de la fase continua o evitando la agitación durante el almacenamiento y/o transporte) y en la disminución de la eficiencia de la colisión (regulando las interacciones coloidales que se establecen entre las gotas). Entre las interacciones coloidales más importantes se encuentran:

***Interacciones electrostáticas:*** la estabilidad frente a la floculación en términos electrostáticos depende de las propiedades del agente emulsificante, del pH y de la fuerza iónica de la fase acuosa (Hunter, 1986). En el caso de las proteínas, valores de pH suficientemente alejados del punto isoeléctrico evitan la floculación de las gotas debido a la alta repulsión electrostática

entre ellas, mientras que valores de pH cercanos al punto isoelectrico (McClements, 2005) producen que la carga neta de las proteínas sea relativamente baja como para que la repulsión electrostática evite la floculación. Adicionalmente, el incremento de la fuerza iónica produce el apantallamiento de las cargas presentes en las proteínas, generando una menor repulsión entre las gotas, generando la floculación de las mismas. La presencia de iones multivalentes en la fase continua tiene un efecto muy importante en la estabilidad frente a la floculación de emulsiones estabilizadas electrostáticamente. En primer lugar, porque es más efectivo el apantallamiento de las cargas en relación a los iones monovalentes y, en segundo lugar, porque son capaces de formar puentes electrostáticos entre dos gotas que presenten la misma carga. Por ejemplo, la adición de iones calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) a una emulsión estabilizada por moléculas de proteína cuyas gotas presentan carga negativa puede favorecer la floculación por dos mecanismos: apantallamiento de cargas con la consecuente reducción de la repulsión y por la formación de puentes proteína-calcio-proteína entre gotas (Dickinson, Hunt & Horne, 1992; Agboola & Dalgleish, 1995, 1996).

***Interacciones estéricas:*** son normalmente repulsivas y protegen la emulsión frente a la floculación y la coalescencia. Sin embargo, si la composición de la fase continua sufre alguna alteración o si se produce un cambio en la temperatura que favorezca las interacciones entre las moléculas adsorbidas, las mismas podrían tornarse atractivas y promover la floculación de las gotas.

***Interacción por puenteo:*** se produce cuando una molécula de un biopolímero se une a dos o más gotas diferentes (McClements, 2005). Por ejemplo, si un biopolímero presenta en su esqueleto varios residuos no polares algunos de ellos podrían asociarse con *patches* hidrofóbicos presentes en diferentes gotas. Este tipo de floculación ocurre normalmente cuando la cantidad de emulsificante utilizado es insuficiente para cubrir por completo la interfase aceite/agua creada durante la homogeneización (Walstra, 1996b).

***Interacciones hidrofóbicas:*** este tipo de interacciones son importantes en emulsiones que contienen gotas con regiones hidrofóbicas expuestas hacia la fase acuosa. Toman importancia cuando la cantidad de emulsificante es insuficiente para saturar completamente la superficie de las gotas (Dickinson, 2003).

**Interacciones por depleción:** se producen cuando en la fase acuosa existen partículas coloidales no adsorbidas en la interfase. Estas partículas pueden ser, por ejemplo, moléculas individuales (Dickinson, Goller & Wedlock 1995; Jenkins & Snowden, 1996) o agregados poliméricos (Dickinson & Golding, 1997a,b). El origen de esta interacción es la exclusión de las partículas coloidales del espacio comprendido entre dos gotas que se aproximan. Esto favorece la aparición de una diferencia de potencial osmótico que favorece la atracción entre las gotas. Generalmente aumentan con el aumento de la concentración y del tamaño del coloide y con el tamaño de gota (McClements, 2000). Son interacciones normalmente débiles y reversibles.

**Interacciones hidrodinámicas:** cuando dos gotas se acercan comienza a aparecer una repulsión entre ellas debido a la resistencia hidrodinámica asociada al flujo de fase continua por fuera del film interfacial. La magnitud de esta resistencia disminuye a medida que la superficie de la interfase adquiere mayor movilidad, lo que genera un aumento en el número de colisiones efectivas.

**Interacciones covalentes:** se producen a través de la formación de puentes disulfuro entre moléculas de proteínas adsorbidas en diferentes gotas. Son interacciones de corto alcance, motivo por el cual es necesario que las gotas se encuentren muy próximas entre sí.

La apariencia, sabor, textura y estabilidad de las emulsiones está fuertemente influenciada por las características de los flóculos formados (número, tamaño, flexibilidad y grado de empaquetamiento) (Walstra, 2003a). La estructura y las propiedades de los flóculos dependen mayormente de las interacciones coloidales e hidrodinámicas entre las gotas, aunque también es importante el mecanismo responsable en la colisión de las gotas (movimiento Browniano, gravedad o agitación mecánica) (Bremer, 1992; Evans & Wennerstrom, 1994). Cuando la atracción entre las gotas es mayor que la energía cinética del sistema los flóculos formados tienden a adquirir una estructura abierta (Figura II.5.). Este tipo de estructura puede producir una red tridimensional a lo largo de toda la emulsión, provocando que la misma se comporte como un gel. Por otra parte, cuando la atracción entre las gotas es menor que la energía cinética del sistema las mismas no siempre permanecen juntas luego de una colisión, sino que van “rodando” unas sobre otras hasta formar un flóculo más densamente empaquetado

(Bijsterbosch, 1995). La existencia de flóculos en una emulsión aumenta la viscosidad de la misma debido al incremento del radio hidrodinámico de las partículas.

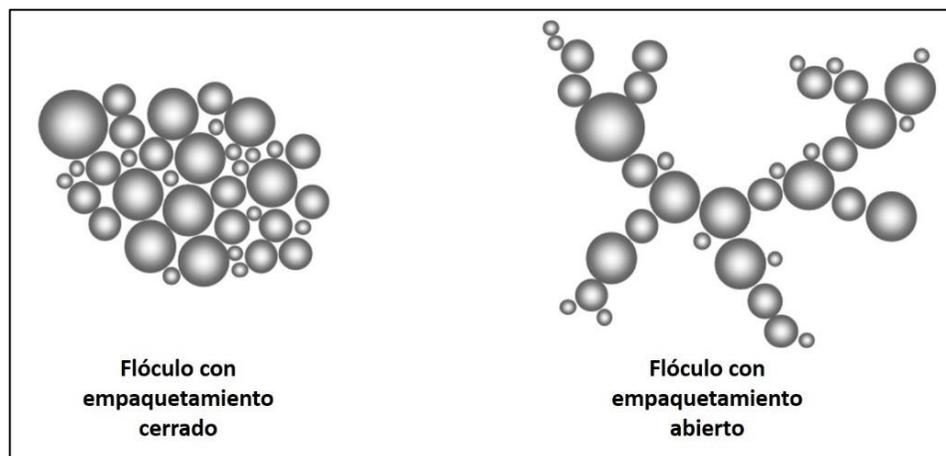


Figura II.5. Esquema de diferentes estructuras de flóculos que pueden formarse en una emulsión o/w. Traducido de McClements (2005).

#### 2.1.2.3.3. Coalescencia

La coalescencia es el proceso por el cual dos o más gotas se fusionan para formar una única gota de mayor tamaño. Es el mecanismo principal a través del cual una emulsión evoluciona hacia un estado termodinámicamente más estable debido a que involucra una disminución en el área de contacto entre la fase acuosa y la lipídica. Este fenómeno causa un aumento en la velocidad de cremado en las emulsiones o/w producto del aumento en el tamaño de las gotas. En líneas generales, la susceptibilidad que presenta un sistema a la coalescencia depende del mecanismo por el cual dos gotas se encuentran (movimiento Browniano, gravedad, agitación mecánica), la naturaleza de las fuerzas que actúan entre las gotas (coloidales, hidrodinámicas) y la resistencia del film interfacial a la ruptura. Otros mecanismos que influyen en este fenómeno son:

***Deformación de la gota:*** se produce debido a un alto empaquetamiento de gotas en el espacio. Cuando la fuerza externa supera la presión de Laplace se producen achatamientos en la superficie de las gotas, lo que conlleva a la pérdida de su forma esférica característica. En la zona de achatamiento disminuye la presión de Laplace, lo que conduce a una menor estabilidad de las gotas. Las gotas de mayor tamaño son más susceptibles a la deformación en relación a las de menor tamaño, que requieren mayores esfuerzos para ser deformadas (Walstra, 2003b).

**Ruptura del film:** la ruptura del film puede ser multicausal. Una causa puede ser la aparición de fluctuaciones vibracionales espontáneas de moléculas de emulsificante en la interfase, produciendo la formación de un hueco en la misma, capaz de interactuar con zonas sin cubrir en otra gota provocando la coalescencia. Otra causa puede ser una cantidad insuficiente de emulsificante, generando zonas sin cubrir en diferentes gotas que al entrar en contacto favorecería la coalescencia (principalmente durante la etapa de homogeneización). La aplicación de un esfuerzo en dirección paralela a la interfase podría generar zonas en donde la concentración de emulsificante disminuya, con el riesgo de la formación de un hueco a través del cual se favoreciera la coalescencia. Este efecto es importante en emulsiones concentradas o con alto grado de floculación sometidas a intensos esfuerzos mecánicos. Por otra parte, en interfases más cohesivas o viscoelásticas (como las formadas por proteínas) se pueden producir desgarramientos por la acción de fuerzas paralelas que pueden exponer la superficie de las gotas (van Aken, 2004). En líneas generales se puede prevenir o reducir la coalescencia disminuyendo el tiempo de contacto entre las gotas (menor frecuencia de colisión, evitar la floculación y/o el cremado), favoreciendo las interacciones repulsivas entre gotas (variando el emulsionante, fuerza iónica, pH) y evitando la ruptura del film interfacial formado en la superficie de la gota. Entre los factores que afectan la coalescencia se encuentran:

**Tipo de emulsificante:** las proteínas normalmente resultan buenos emulsificantes, especialmente bajo condiciones de reposo (Dickinson, 1992; van Aken, 2002, 2004). Esto se debe a que producen emulsiones con tamaños de gotas pequeños, rodeadas de un film interfacial viscoelástico resistente a la ruptura que proporciona interacciones repulsivas (electrostáticas y/o estéricas) de gran magnitud (dependiendo del pH y la fuerza iónica del medio).

**Influencia de las condiciones del medio y del almacenamiento:** las emulsiones pueden sufrir coalescencia cuando se las expone a esfuerzos mecánicos prolongados (van Aken, 2004). La congelación de las emulsiones es un proceso que puede aumentar la coalescencia en el sistema debido a un aumento en la concentración de gotas y de sales en las zonas que permanezcan líquidas. Esta combinación de gotas confinadas en el espacio con cambios en las condiciones del solvente es suficiente para provocar la ruptura del film interfacial y promover la coalescencia una vez que la emulsión es descongelada (Berger, 1997). A su vez, el congelado puede producir la deshidratación de las moléculas adsorbidas en la superficie de las gotas

promoviendo su interacción. En ausencia de sustancias crioprotectoras la estabilidad de emulsiones o/w frente al proceso de congelado/descongelado depende de varios factores tales como la concentración proteica y el envejecimiento de la muestra (Palazolo & Wagner, 2010; Palazolo, Sobral & Wagner, 2011). A su vez, la incorporación de sustancias crioprotectoras, como suero de *tofu* deshidratado, aumenta la estabilidad de las emulsiones frente a la coalescencia (Palazolo, Sobral & Wagner, 2013).

Reacciones químicas o bioquímicas, como la oxidación de lípidos o la hidrólisis enzimática de proteínas o polisacáridos, también pueden promover la coalescencia (McClements, 2005).

***Influencia de impurezas:*** la presencia de pequeñas impurezas, como partículas sólidas, pueden provocar la ruptura del film interfacial, especialmente durante la aplicación de esfuerzos mecánicos (van Aken, 2004).

*Los ensayos que se describen a continuación fueron realizados en bajo la supervisión del Dr. Marc Anton en el laboratorio Biopolymères, Interactions, Assemblages-Interfaces et Systemes Dispersés (BLA-ISD) del Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)-Centro Nantes-Angers (Francia) y de la Prof. Dr. Marie de Lamballerie en ONIRIS, École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de L'alimentation en el marco de una beca para doctorandos en Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (Bec.Ar.) otorgada por la Jefatura de Gabinete de Ministros, Presidencia de la Nación (Mayo 2014 – Noviembre 2014).*

## **2.2. Materiales y métodos**

### **2.2.1. Caracterización fisicoquímica de dispersiones de APS utilizadas para preparar emulsiones o/w**

#### **2.2.1.1. Preparación de APS**

Se obtuvo el APS de la misma manera que se describió en la sección 1.1.1. Una vez obtenido el aislado se determinó su contenido proteico mediante el método de Kjeldahl (Kjeldahl, 1883) utilizando un factor de conversión 5,85. El valor obtenido fue  $81,6 \pm 0,2 \%$ .

#### **2.2.1.2. Preparación de dispersiones de APS**

Se prepararon dispersiones de APS 5 o 10 g de proteína.L<sup>-1</sup> en *buffer* BIS-TRIS 30 mmol.L<sup>-1</sup> pH 5,9 o *buffer* TRIS-HCl 50 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,0 y se mantuvieron en agitación durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente una alícuota de ellas fue adicionada con CaCl<sub>2</sub> hasta alcanzar una concentración final de 1,25 y 2,5 mmol.L<sup>-1</sup> para las dispersiones a pH 5,9 (5 o 10 g de proteína.L<sup>-1</sup>, respectivamente) o de 2,5 y 5 mmol.L<sup>-1</sup> para el caso de las dispersiones a pH 7,0 (5 o 10 g de proteína.L<sup>-1</sup>, respectivamente). Luego del agregado de CaCl<sub>2</sub> el pH fue ajustado a los valores correspondientes mediante el agregado de NaOH o HCl 2,0 mol.L<sup>-1</sup>. De manera adicional se prepararon muestras en las cuales el CaCl<sub>2</sub> en las mismas concentraciones fue adicionado posteriormente al tratamiento con APH. Esta evaluación fue realizada solo en las dispersiones de APS 5 g de proteína.L<sup>-1</sup>.

Los valores de pH y concentración de CaCl<sub>2</sub> elegidos para realizar los estudios fueron condiciones en las cuales se observó un importante efecto de la aplicación de APH sobre la solubilidad proteica en agua bidestilada (Capítulo I). Cuando las concentraciones de proteína fueron 5 g.L<sup>-1</sup>, con el objetivo de mantener la misma relación calcio/proteína, las concentraciones de CaCl<sub>2</sub> adicionadas fueron reducidas también a la mitad.

### 2.2.1.3. Tratamiento con APH

Las dispersiones de APS, con o sin CaCl<sub>2</sub> y con valores de pH debidamente ajustados, fueron colocadas en bolsas de polietileno (La Bovida, Francia) y envasadas al vacío. Posteriormente las mismas fueron colocadas en la cámara de presurización de un equipo de alta presión marca ACB Pressure System (Nantes, Francia) con una capacidad de 3 L y una presión máxima de trabajo de 600 MPa. El equipo cuenta con una camisa de refrigeración por la cual circula agua fría y un dispositivo que permite regular su temperatura (Julabo, Seelbach, Alemania). El fluido de compresión utilizado fue agua destilada. Los tratamientos fueron realizados a  $600 \pm 7$  MPa durante 5 min a una temperatura inicial de 20 °C medida en el fluido de presurización (termocupla tipo K), habiéndose alcanzado una temperatura final máxima de 25 °C debido al calentamiento por compresión. La rampa de presurización fue de 3,4 MPa.s<sup>-1</sup> mientras que la despresurización fue prácticamente instantánea.

### 2.2.1.4. Diseño experimental

Las dispersiones proteicas se caracterizaron evaluando el efecto del pH (5,9 y 7,0), la concentración proteica (5 y 10 g de proteína.L<sup>-1</sup>), la relación calcio/proteína (0,25 mmol de calcio/g de proteína para pH 5,9 y 0,5 mmol de calcio/g de proteína para pH 7,0) y el nivel de presión aplicado (0,1 o 600 MPa) sobre la solubilidad proteica, la turbidez, el potencial- $\zeta$ , el tamaños de los agregados, presión superficial y reología interfacial.

Las emulsiones se caracterizaron evaluando el efecto del pH (5,9 y 7,0), la concentración proteica (5 y 10 g de proteína.L<sup>-1</sup>), la relación calcio/proteína (0,25 mmol de calcio/g de proteína para pH 5,9 y 0,5 mmol de calcio/g de proteína para pH 7,0) y el nivel de presión aplicado (0,1 o 600 MPa) sobre el tamaño de partícula, estabilidad frente a la coalescencia y la floculación, microestructura, cuantificación y caracterización de proteínas en la interfase. Cada muestra fue realizada por duplicado, mientras que las determinaciones de los parámetros evaluados sobre cada una de las mismas fueron realizadas por triplicado.

Con la finalidad de facilitar la lectura del presente capítulo se utilizó la nomenclatura consignada en la Tabla II.2.

Tabla II.2. Nomenclatura de las diferentes dispersiones de APS caracterizadas y utilizadas en la elaboración de emulsiones o/w.

Concentración de proteína (g.L <sup>-1</sup> )	Concentración de calcio incorporado (mmol.L <sup>-1</sup> )	pH	Nivel de presión (MPa)	Nomenclatura
5	0	5,9	0,1	APS <sub>0,5</sub> -0Ca - pH5,9 - 0,1
5	0	5,9	600	APS <sub>0,5</sub> -0Ca - pH5,9 - 600
5	1,25	5,9	0,1	APS <sub>0,5</sub> -1,25Ca - pH5,9 - 0,1
5	1,25	5,9	600	APS <sub>0,5</sub> -1,25Ca - pH5,9 - 600
5	0	7,0	0,1	APS <sub>0,5</sub> -0Ca - pH7,0 - 0,1
5	0	7,0	600	APS <sub>0,5</sub> -0Ca - pH7,0 - 600
5	2,5	7,0	0,1	APS <sub>0,5</sub> -2,5Ca - pH7,0 - 0,1
5	2,5	7,0	600	APS <sub>0,5</sub> -2,5Ca - pH7,0 - 600
10	0	5,9	0,1	APS <sub>1</sub> -0Ca - pH5,9 - 0,1
10	0	5,9	600	APS <sub>1</sub> -0Ca - pH5,9 - 600
10	2,5	5,9	0,1	APS <sub>1</sub> -2,5Ca - pH5,9 - 0,1
10	2,5	5,9	600	APS <sub>1</sub> -2,5Ca - pH5,9 - 600
10	0	7,0	0,1	APS <sub>1</sub> -0Ca - pH7,0 - 0,1
10	0	7,0	600	APS <sub>1</sub> -0Ca - pH7,0 - 600
10	5	7,0	0,1	APS <sub>1</sub> -5Ca - pH7,0 - 0,1
10	5	7,0	600	APS <sub>1</sub> -5Ca - pH7,0 - 600

En la tabla se especifica la concentración de proteína utilizada en cada dispersión (g.L<sup>-1</sup>), la concentración de calcio adicionada (mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>), el pH final ajustado luego de la incorporación de calcio y el nivel de presión utilizado en los tratamientos con APH (MPa).

#### 2.2.1.5. Determinación de solubilidad proteica

La concentración de proteína soluble fue determinada por el método del ácido bicinónico (BCA) (Smith *et al.* 1985), utilizando un kit comercial (Sigma, St. Louis, EEUU) de la misma forma descrita en la sección 1.1.6.3. Las lecturas de absorbancia fueron realizadas utilizando un lector de placas Epoch (BioTek Instruments Inc., Winooski, EEUU) a una longitud de onda de 562 nm. Los resultados se expresaron como:

$$S\% = P_s \times 100 / P_i$$

siendo S% el porcentaje de proteína soluble (definida como aquella que se encuentra en el sobrenadante luego del proceso de centrifugación en las condiciones mencionadas anteriormente en relación a la proteína total), P<sub>s</sub> la concentración proteica en el sobrenadante en g.L<sup>-1</sup> y P<sub>i</sub> la concentración inicial de proteína (5 g.L<sup>-1</sup> o 10 g.L<sup>-1</sup>).

$$IS\% = (S_{APH} - S_0) \times 100 / S_0$$

Siendo IS% el incremento relativo en el porcentaje de proteína soluble,  $S_0$  el porcentaje de proteína soluble antes del tratamiento con APH y  $S_{APH}$  el porcentaje de proteína soluble después del tratamiento con APH, bajo las mismas condiciones de concentración de calcio y APH.

#### 2.2.1.6. Determinación de turbidez

Se determinó la turbidez de las muestras sin centrifugar y centrifugadas en centrífuga modelo Jouan GR 20-22 (Thermo Scientific, Waltham, EEUU) en distintas condiciones de aceleración a 3000 o 10000 g durante 20 min a 4 °C, mediante la medición de la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón). Los resultados se expresaron en unidades de absorbancia (ua).

#### 2.2.1.7. Análisis de distribución de tamaño de agregados

La técnica de dispersión de luz dinámica (DLS, *Dynamic Light Scattering*), también conocida como espectroscopía de correlación de fotones (PCS, *Photon Correlation Spectroscopy*) evalúa el movimiento Browniano y lo relaciona con el tamaño de las partículas a través del análisis de las fluctuaciones que ocurren en la intensidad de la luz dispersada por la muestra. El movimiento Browniano es el movimiento de las partículas debido a la colisión aleatoria con las moléculas del líquido que las rodea, siendo más lento el movimiento cuanto mayor sea su tamaño. La velocidad del movimiento Browniano se define a través de una propiedad conocida como coeficiente de difusión translacional (D). El tamaño de las partículas se calcula a través de dicho coeficiente mediante el uso de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d(H) = k T / 3 \pi \eta D$$

donde d es el diámetro hidrodinámico, k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y  $\eta$  es la viscosidad. El diámetro así obtenido es el correspondiente a una esfera que posee el mismo coeficiente de difusión translacional que la partícula. A partir de las velocidades de fluctuación en los patrones de intensidad de luz dispersada (fluctuaciones rápidas corresponden a partículas pequeñas) se obtiene la distribución del tamaño de partícula presente en la muestra.

2.2.1.7.1. Metodología

Las determinaciones se realizaron en un equipo de dispersión de luz dinámica Zetasizer Nano-Zs (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Una fuente de láser ilumina la muestra contenida en una cubeta. La mayor parte del haz atraviesa la muestra mientras que una pequeña fracción es dispersada por las partículas en suspensión y es detectada por un detector ubicado en un ángulo de  $173^\circ$  con respecto a la trayectoria del haz incidente. Un atenuador ubicado antes de la muestra regula la intensidad del haz de manera tal que la intensidad de la luz dispersada sea la adecuada para que el detector realice la medición con éxito. La señal pasa del detector a una unidad de procesamiento digital que compara las intensidades de luz dispersada en intervalos de tiempo sucesivos de manera tal de encontrar la velocidad de fluctuación. Por último, la información es recogida por un ordenador en que el software Zetasizer Nano analiza los datos y produce la distribución del tamaño de partícula (Figura II.6.).

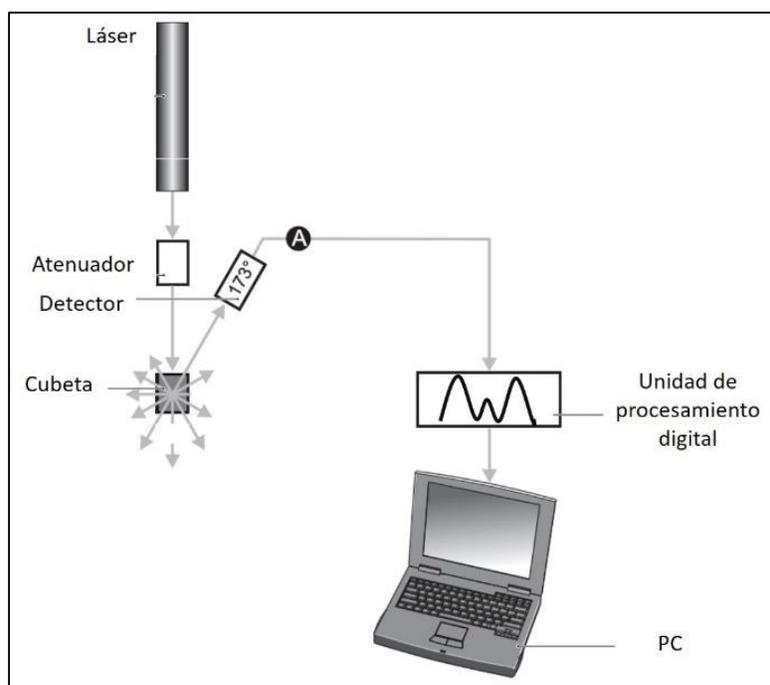


Figura II.6. Esquema básico que muestra el fundamento del funcionamiento del Zetasizer Nano-Zs para la determinación de dispersión de luz dinámica.

El análisis de la distribución del tamaño de partículas se realizó sobre las muestras control y las tratadas con APH, sin centrifugar o centrifugadas a 3000 o 10000 g durante 20 min a 4 °C en las dispersiones 5 g de proteína.L<sup>-1</sup>. El análisis de dispersión de luz dinámica de las dispersiones 10 g de proteína.L<sup>-1</sup> fue determinada solo en las muestras sin centrifugar. Las mismas fueron colocadas, sin producir burbujas de aire, en cubetas plásticas de 2 mL de capacidad marca Zetasizer Nano Series modelo ZEN 0112 (Malvern Instruments Worcestershire, Reino Unido). Posteriormente la cubeta fue colocada en el equipo y termostatzada a 20 °C durante 2 min. El equipo realiza, por cada muestra, tres determinaciones sucesivas de 120 s cada una. En el caso de muestras turbias y con alto grado de polidispersidad se ensayaron diluciones con el *buffer* correspondiente a fin de poder realizar la medida. La distribución del tamaño de partícula se expresó en función de la intensidad.

#### 2.2.1.8. Determinación del potencial- $\zeta$

La determinación del potencial- $\zeta$  se realizó sobre las muestras control y tratadas con APH, sin centrifugar o centrifugadas a 3000 o 10000 g durante 20 min a 4 °C, de la misma manera descrita en la sección 1.1.7.1. Las muestras fueron diluidas con los mismos *buffers* que los utilizados en la preparación de las dispersiones de APS, pero de menor concentración de manera de reducir la conductividad eléctrica y poder realizar la medición en forma adecuada. Las muestras con alto grado de polidispersidad se dejaron decantar durante 30 min previo al llenado de la cubeta. La determinación fue realizada únicamente en las dispersiones de APS 5 g de proteína.L<sup>-1</sup>.

#### 2.2.1.9. Curvas de presión superficial en la balanza de Langmuir: adsorción en interfase aire/líquido

La balanza de Langmuir es una adaptación de la placa de Wilhelmy que permite medir la tensión superficial en la superficie aire/líquido.

##### 2.2.1.9.1. Método de la placa de Wilhelmy

El método de la placa de Wilhelmy es ampliamente utilizado en el estudio de la cinética de adsorción de proteínas en una interfase (Dickinson, 1992). El dispositivo consiste en una lámina delgada, conectada a una balanza electromecánica de precisión, sumergida en un líquido. El líquido que rodea la placa asciende por los bordes de la misma formando un

menisco (Figura II.7.). En este punto el peso asociado al menisco de líquido sobre la placa se encuentra en equilibrio con la componente vertical de la tensión superficial,  $\gamma \cos \theta$ , multiplicada por el perímetro de la placa:

$$F = 2 (d + w) \gamma \cos \theta \quad (1)$$

donde  $w$  y  $d$  son la longitud y espesor de la placa, respectivamente y  $\theta$  el ángulo de contacto.

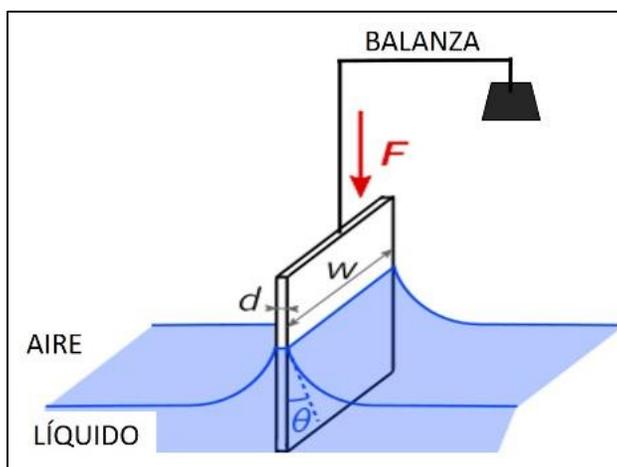


Figura II.7. Esquema sencillo de la placa de Wilhelmy sobre la superficie de un líquido

De esta manera la tensión superficial del líquido puede determinarse midiendo la fuerza ejercida sobre la placa. Normalmente las placas suelen confeccionarse de materiales como el platino, platino/iridio, o en nuestro caso papel absorbente, los cuales producen un ángulo de contacto cercano a cero, facilitando el posterior análisis. En estos casos la ecuación (1) se simplifica a:

$$\gamma = F / 2 (d + w)$$

siendo la tensión superficial directamente proporcional al peso del líquido adherido a la placa. Todas las medidas deben realizarse a temperatura controlada debido a la dependencia de la tensión superficial con la temperatura.

#### 2.2.1.9.2. Balanza de Langmuir

La presencia de tensioactivos en un líquido produce el descenso de la tensión superficial. Esta disminución depende de la concentración de los mismos en la superficie. En la balanza de

Langmuir la variación de la concentración de tensioactivo se realiza a través de la modificación del tamaño de la superficie.

La balanza de Langmuir consiste en una cuba de teflón y dos barreras móviles del mismo material que al ser desplazadas en forma precisa mediante un sistema automatizado permite variar el área de la cuba, y como consecuencia de ello, la densidad de tensioactivo por unidad de superficie (Figura II.8).

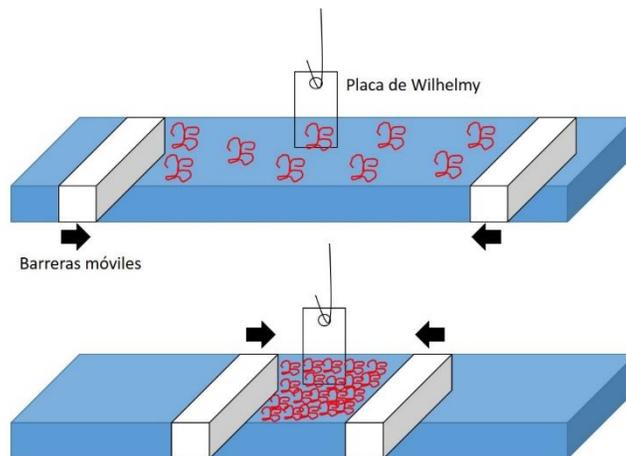


Figura II.8. Representación de la cuba de la balanza de Langmuir antes y después del proceso de disminución de la superficie por el cierre de las barreras móviles.

La reducción de la tensión superficial suele expresarse en función de la presión superficial,  $\pi$ , como la diferencia entre la tensión superficial del líquido puro,  $\gamma_0$ , y la tensión del líquido en cuya interfase se encuentran moléculas tensioactivas,  $\gamma$ .

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

Como resultado de la disminución de  $\gamma$  por la presencia de tensioactivos en la superficie aire/líquido se produce un aumento de la presión superficial  $\pi$ .

#### 2.2.1.9.3. Metodología

Las experiencias se realizaron en una balanza de Langmuir modelo Nima 601 BAM (Nima Technology Ltd., Coventry, Reino Unido) acoplada a un sensor de presión superficial tipo PS4 (Nima Technology Ltd., Coventry, Reino Unido). Como placa de Wilhelmy se utilizó un papel de filtro Whatman 43 de 1 cm x 1 cm, completamente humedecible. Tanto la cuba como las barreras se desengrasaron con acetona y se limpiaron finalmente con agua ultra pura. La pureza

de los *buffers* fue chequeada a través de un ciclo de compresión previo a la siembra de las muestras. El sistema se consideró perfectamente limpio cuando la presión superficial alcanzada fue menor a  $0,05 \text{ mN.m}^{-1}$ . Para realizar los ensayos se utilizó el sobrenadante de las dispersiones de APS  $5 \text{ g de proteína.L}^{-1}$  control y tratadas con APH, con o sin adición de calcio, luego de haberlas centrifugado a  $10000 \text{ g}$  durante  $20 \text{ min}$  a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  a ambos valores de pH. Se sembraron  $16 \text{ }\mu\text{g}$  de proteína con una microjeringa cubriendo toda la superficie del *buffer*, de las mismas características que los utilizados en la preparación de las dispersiones, contenido en la cuba de la balanza termostaticada a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . El área inicial, con las barreras abiertas, fue de  $230 \text{ cm}^2$ . Se dejó el sistema por  $30 \text{ min}$  para que las proteínas se puedan adsorber y reordenar en la superficie. Transcurrido ese lapso se procedió a disminuir el área de la balanza. Esto se hizo a una velocidad de cierre de las barreras que produjo una disminución del área de  $40 \text{ cm}^2.\text{min}^{-1}$  hasta llegar a un valor final de área de  $55 \text{ cm}^2$ . Las variaciones detectadas por la placa fueron registradas a lo largo de todo el proceso por un adquisidor de datos conectados a una PC. A partir de los datos registrados se obtuvieron las curvas de presión superficial en función del área (isotermas de adsorción) y, adicionalmente, se calcularon las derivadas de la presión superficial en función del área para cada una de las muestras según Pérez *et al.* (2015).

#### 2.2.1.10. Tensiometría de gota dinámica y reología interfacial

Para profundizar el conocimiento del comportamiento en interfase de las proteínas de soja se realizaron estudios de reología interfacial, mediante tensiometría de gota dinámica, sobre aquellas muestras que arrojaron diferencias en las curvas de tensión superficial obtenidas mediante la balanza de Langmuir.

##### 2.2.1.10.1. Tensiometría de gota dinámica

La tensión interfacial entre dos líquidos o entre un líquido y un gas puede ser determinada a partir del estudio del contorno de una gota que presente una simetría de revolución. La forma de la gota estará determinada por la tensión interfacial y por el efecto de la atracción gravitatoria. La tensión interfacial forzarán a la gota a adoptar una forma esférica mientras que la gravedad tenderá a elongarla o aplastarla dependiendo si es una gota pendiente o montante, respectivamente. Cuando las contribuciones de estos dos efectos son similares es posible determinar la forma del contorno de la gota y el ángulo de contacto formado con el soporte. La gota es formada mediante un tensiómetro de gota dinámico, el cual es una modificación del

tensiómetro de gota automático desarrollado por Cagna *et al.* (1992). Posteriormente, la tensión interfacial es determinada digitalizando y analizando el perfil de la gota a través de una cámara digital conectada a una PC (Figura II.9.). El perfil de la gota es procesado aplicando la ecuación fundamental de Laplace al perfil de la misma:

$$\frac{1}{x} \frac{d}{dx} (x \sin \theta) = \frac{2}{b} - cz$$

donde x y z son las coordenadas cartesianas para cualquier punto ubicado en el perfil de la gota, b es el radio de curvatura en el ápice,  $\theta$  es el ángulo formado por la tangente en el perfil de la gota y el eje x, y c es la constante de capilaridad definida como  $c = g \Delta\rho/\gamma$ , donde g es la aceleración de la gravedad,  $\Delta\rho$  es la diferencia de densidades entre los fluidos y  $\gamma$  la tensión interfacial (Benjamins, Cagna & Lucassen-Reynders, 1996). La computadora calcula tres parámetros de la gota: área, volumen y tensión interfacial varias veces por segundo, mediante un software especial.

En este estudio se utilizó una burbuja montante inmersa en una dispersión de proteína.

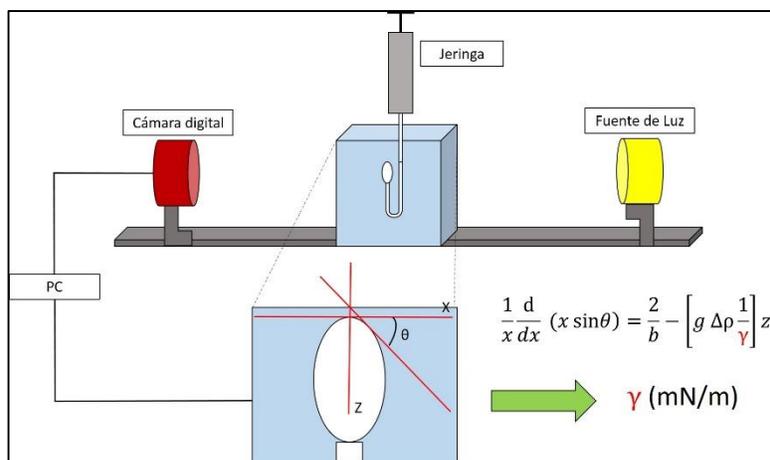


Figura II.9. Esquema que muestra las partes principales del tensiómetro de gota y el cálculo de la tensión superficial a partir del perfil de la burbuja.

2.2.1.10.2. Reología interfacial

La reología interfacial se estudió por reología dilatacional. En esta técnica la interfase es sometida a pequeñas expansiones y compresiones periódicas de manera sinusoidal, a una frecuencia y una amplitud determinada. El módulo viscoelástico ( $E$ ) es un número complejo con una parte real  $E'$  (módulo elástico), que representa la energía almacenada, y una parte imaginaria  $E''$  (módulo viscoso) asociada a mecanismos que disipan la energía mecánica (Lucassen & van den Tempel, 1972):

$$E = E' + i E''$$

Cuando una interfase viscoelástica es deformada en forma sucesiva a una frecuencia  $\omega$ , y a una amplitud  $\Delta A$ , puede aparecer un desfase entre la variación de la deformación ( $\Delta A/A_0$ , siendo  $A_0$  el área inicial de la gota) y la tensión interfacial, representado por el valor del ángulo de desfase,  $\varphi$ . Las contribuciones elásticas y viscosas pueden determinarse en forma individual a partir del valor absoluto del módulo viscoelástico  $|E|$  y el ángulo de desfase  $\varphi$  (Lucassen & Barnes, 1972).

$$E' = |E| \cos \varphi \quad ; \quad E'' = |E| \sin \varphi$$

El valor de  $E$  puede calcularse según la siguiente fórmula:

$$|E| = [(E')^2 + (E'')^2]^{1/2}$$

Un aumento del valor de  $E$  está relacionado con una mayor resistencia de la interfase a la deformación. En nuestro caso la deformación sinusoidal de la interfase se realizó una vez que el film llegó a una tensión superficial de  $62,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ . El tiempo requerido para alcanzar dicho estado de pseudo-equilibrio fue mayor a  $10^4 \text{ s}$ .

2.2.1.10.2.1. Metodología

Las medidas fueron realizadas en un tensiómetro de gota automático (IT-Concept, Francia) descrito por Benjamins, Cagna y Lucassen-Reynders (1996). Para los ensayos se utilizaron los sobrenadantes obtenidos por centrifugación ( $10000 \text{ g}$ ,  $20 \text{ min}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) de las muestras en las cuales se observaron diferencias en las cinéticas de adsorción obtenidas mediante la balanza de Langmuir, previa dilución en los *buffers* hasta una concentración de  $0,001 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Se colocaron

aproximadamente 6 mL de la dispersión proteica en una cubeta de cuarzo termostata a  $20,0 \pm 0,2$  °C. El equipo (Figura II.9.) consta de una jeringa con una aguja en forma de U que se sumerge dentro de la dispersión proteica. Con la jeringa se forma una burbuja de aire la cual es analizada digitalmente para obtener los valores de tensión interfacial dinámica. En los ensayos se crearon burbujas con un volumen de 8  $\mu\text{L}$  que tenían, al inicio de las experiencias, una superficie de 18  $\text{mm}^2$ . Se midió la tensión interfacial dinámica hasta que se alcanzó un valor de 62,5  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (equivalente a una presión superficial de 10  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ). Posteriormente se hicieron las medidas de reología interfacial dilatacional. Se realizaron expansiones y compresiones periódicas sinusoidales del volumen de la burbuja. Para ello se utilizaron frecuencias de 0,005 Hz durante 2000 s, 0,01 Hz durante 1000 s, 0,02 Hz durante 500 s y 0,05 Hz durante 200 s, en períodos que correspondieron en todos los casos al 10 % del valor del tiempo. La amplitud relativa ( $\Delta A/A_0$ ) fue de 0,005 para las frecuencias de 0,005 Hz y 0,01 Hz, y de 0,05 para las de 0,02 Hz y 0,05 Hz. Ambos valores se encontraron dentro del rango de viscoelasticidad lineal. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Todos los cálculos de la tensión interfacial a partir del perfil laplaciano de la gota y de los módulos viscoelástico ( $E'$ ), elástico ( $E''$ ) y viscoso ( $E'''$ ) a partir de las curvas sinusoidales, se realizaron con el software Windrop 2009.

## 2.2.2. Caracterización de emulsiones o/w preparadas a partir de dispersiones de APS.

### 2.2.2.1. Preparación de las emulsiones

Las emulsiones fueron preparadas a partir de dispersiones de APS 5 y 10 g de proteína. $\text{L}^{-1}$  a pH 5,9 o 7,0 control y tratadas con APH, en las que el  $\text{CaCl}_2$ , en las concentraciones correspondientes, fue agregado antes del tratamiento. Se usaron 70 g de dispersión para emulsionar 25 g de aceite refinado de girasol ( $\delta = 0,9130 \pm 0,0006$   $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). La relación volumétrica de aceite/agua ( $\Phi$ ) utilizada fue 0,28. La homogeneización se realizó en dos etapas. La primera consistió en la formación de las gotas mediante un agitador rotatorio de alta velocidad Polytron type Silent Crusher M (Heidolph Instruments, Alemania) a 20000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente, usando un rotor Heidolph Typ de 12 mm de diámetro sumergido hasta la mitad del volumen de líquido contenido en un vaso de vidrio GS 25 de 50 mm de diámetro y 150 mm de altura (©Kinemática AG, Lucerna, Suiza). Durante este tiempo se realizaron movimientos ascendentes y descendentes para permitir que toda la mezcla sea emulsificada. La segunda parte tuvo como finalidad disminuir el tamaño de las gotas formadas.

Para ello se hizo pasar la mezcla por un homogenizador a válvula modelo TC5W (Stansted Fluid Power Ltd., Reino Unido) a 120 bar de presión durante 5 min con recirculación. El vaso conteniendo la emulsión estuvo ubicado dentro de un baño de hielo.

#### 2.2.2.2. Distribución del tamaño de partícula

##### 2.2.2.2.1. Principio

El método consiste en el análisis de los patrones de difracción y refracción de luz láser producido por la presencia de partículas (en nuestro caso gotas de aceite o flóculos en una emulsión o/w), las cuales desviarán la luz en todas direcciones, con un patrón de intensidades dependiente del diámetro de las partículas. La técnica se basa en las teorías de Fraunhofer y Mie. Según Fraunhofer existe una relación inversa entre el diámetro de las partículas y el ángulo de difracción. Cuando el diámetro de las partículas es mayor que la longitud de onda utilizada puede aplicarse la teoría de Fraunhofer. Cuando el diámetro es inferior a  $50\ \mu\text{m}$  debe aplicarse la teoría de Mie, la cual tiene en cuenta los índices de refracción complejos de la partícula y del medio dispersante. La parte real de estos índices está relacionada con la velocidad de la luz en diferentes medios, mientras que la parte imaginaria considera la absorción por parte del material. El análisis se realiza sobre todas las partículas que se encuentren sobre la trayectoria de un haz de luz láser mediante la determinación de las intensidades de la luz difractada a diferentes ángulos. Una lente enfoca el patrón de difracción obtenido sobre los anillos de un detector montado en el plano focal de la lente (Figura II.10). Posteriormente estos patrones son transformados en una distribución de tamaño de partícula según la teoría de Mie.

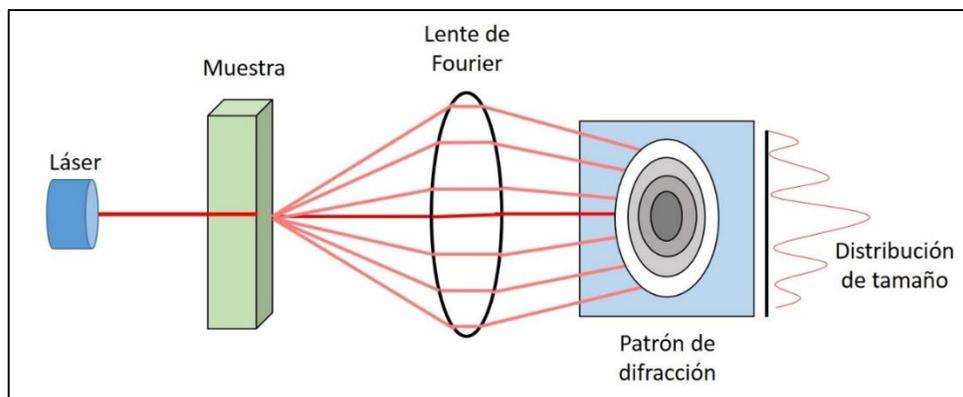


Figura II.10. Esquema que muestra el fundamento del análisis del tamaño de partícula por difracción de luz.

#### 2.2.2.2.2. Metodología

Las distribuciones de tamaño de partícula fueron realizadas en un analizador láser Mastersizer 3600 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido). Las medidas fueron realizadas en ausencia y presencia de SDS el cual, al cargar negativamente las gotas, ya sea a través de la formación de complejos proteína-SDS o al reemplazarlas en la interfase si el tiempo es suficiente, produce repulsión electrostática entre las gotas evitando la floculación de las mismas. Para ello se mezclaron 250  $\mu\text{L}$  de emulsión con 5 mL de *buffer* conteniendo 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de SDS. Se agitó suavemente por inversión y se dejó 1 h para su estabilización. Las mediciones se realizaron inmediatamente luego de preparada la emulsión, a los 3 y a los 8 días de almacenamiento a 4 °C. Para ello se agregaron unas gotas de emulsión dentro de la unidad de dispersión con agitación rotacional Hydro SM (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido) conteniendo agua destilada hasta alcanzar una obscuración entre 5 y 10 %. Los parámetros establecidos para los cálculos fueron 1,4564 para el índice de refracción del aceite, absorbancia de la dispersión igual a 0,1 y 1,33 para el índice de refracción de las dispersiones.

#### 2.2.2.2.3. Tratamiento de los resultados

Se calcularon diferentes parámetros estadísticos a partir de la distribución de tamaño de gota. El  $d_{3,2}$  o diámetro medio de Sauter brinda información acerca de la superficie creada durante la emulsificación. La distribución de los  $d_{3,2}$  muestra la contribución que hacen las gotas de los diferentes rangos de tamaño a la superficie total creada. Por otra parte, las distribuciones  $d_{4,3}$  (diámetro de De Brouckere) representan el porcentaje con el que cada uno de los rangos contribuye al volumen total de aceite utilizado. A partir del valor de  $d_{3,2}$  correspondiente a la emulsión en presencia de SDS, se calculó el área interfacial específica ( $S_v$ ) según Walstra (1983):

$$S_v = 6 \Phi / d_{3,2} \text{ (m}^2\cdot\text{mL}^{-1} \text{ de emulsión)}$$

#### 2.2.2.3. Obtención de imágenes mediante microscopía óptica

Las microfotografías fueron obtenidas en un microscopio Zeiss Axioskop 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) acoplado a una cámara fotográfica digital Photometrics CH250 (Photometrics Ltd., Tucson, EEUU). Inmediatamente luego de obtenida la emulsión se colocaron 200  $\mu\text{L}$  en 5 mL de *buffer* sin o con SDS 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Se agitó suavemente por inversión,

se depositaron 20  $\mu\text{L}$  de la mezcla sobre un portaobjetos y se cubrió cuidadosamente con un cubreobjetos. Se realizó la observación microscópica usando un aumento de 400 X y se tomaron fotografías.

#### 2.2.2.4. Determinación del índice de floculación

Se calculó el índice de floculación inmediatamente luego de preparada la emulsión, a los 3 y a los 8 días de almacenamiento de las emulsiones a 4 °C, como el cociente entre el valor del  $d_{4,3}$  de la emulsión sin SDS respecto al  $d_{4,3}$  en presencia de SDS.

#### 2.2.2.5. Cuantificación y caracterización molecular de proteína adsorbida en la interfase

La técnica de Patton y Huston (1986), adaptada por Le Denmat, Anton y Beaumal (2000) se basa en la separación de lipoproteínas mediante centrifugación en un gradiente de sacarosa. Esta técnica permite separar las gotas lipídicas de la fase continua y lavarlas en forma simultánea. Para ello se tomaron 2 mL de emulsión fresca (se determinó su peso) y se mezclaron cuidadosamente con 2 mL de solución de sacarosa 50 %p/p de manera de aumentar la densidad de la fase continua. Los 4 mL resultantes fueron depositados suavemente, mediante una jeringa metálica, en el fondo de un tubo de polipropileno graduado de 15 mL conteniendo 10 mL de solución de sacarosa 5 %p/p previamente tarado (se determinó la masa total depositada). Los tubos fueron centrifugados a 3000 g durante 2 h a 10 °C. Luego de la centrifugación se observaron 3 fases: una superior conformada por gotas de aceite recubiertas de proteína interfacial (FC, fase crema), una fase intermedia (FCm) conformada por minúsculas gotas de aceite con proteína adsorbida que no llegaron a migrar a la fase superior y una inferior (FN) conteniendo las proteínas no adsorbidas de la fase continua. Inmediatamente los tubos fueron congelados a -20 °C en posición vertical hasta su uso. Los tubos congelados fueron cortados mediante una sierra eléctrica en una posición del tubo que permitió separar las 3 fases. Cada una de ellas fue colocada cuantitativamente en diferentes frascos de plástico previamente tarados, y se descongelaron a temperatura ambiente. A la FC se le agregó la cantidad necesaria de *buffer* 10 g de  $\text{SDS.L}^{-1}$  de manera de lograr una dilución final 1/3. La función del SDS es desplazar las proteínas de la interfase por ser mejor tensioactivo. Las mezclas con la FC y el SDS se agitaron en vortex, se las dejó reposar durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente fueron centrifugadas a 3000 g durante 1 h a 10 °C. Se recuperó la fase inferior de los tubos conteniendo las proteínas desorbidas.

Se analizaron las proteínas de las 3 fases por electroforesis SDS-PAGE (sección 1.1.2.) (Figura II.11.)

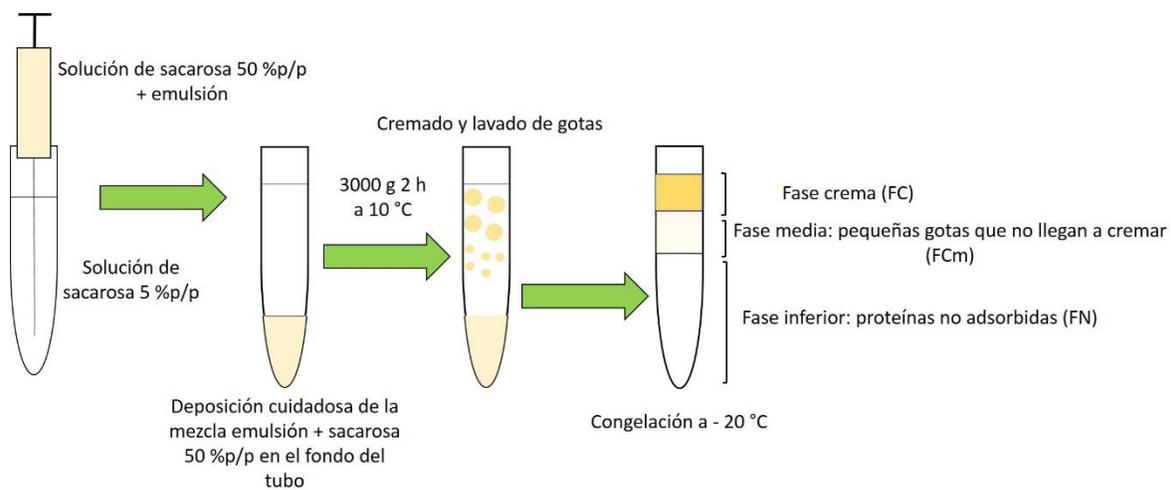


Figura II.11. Esquema de separación y lavado de gotas de la emulsión de la fase continua.

### 2.3. Resultados y discusión

Con la finalidad de facilitar la lectura del presente capítulo se utilizó la nomenclatura consignada en la Tabla II.3.

Tabla II.3. Nomenclatura de las diferentes dispersiones de APS caracterizadas y utilizadas en la elaboración de emulsiones o/w.

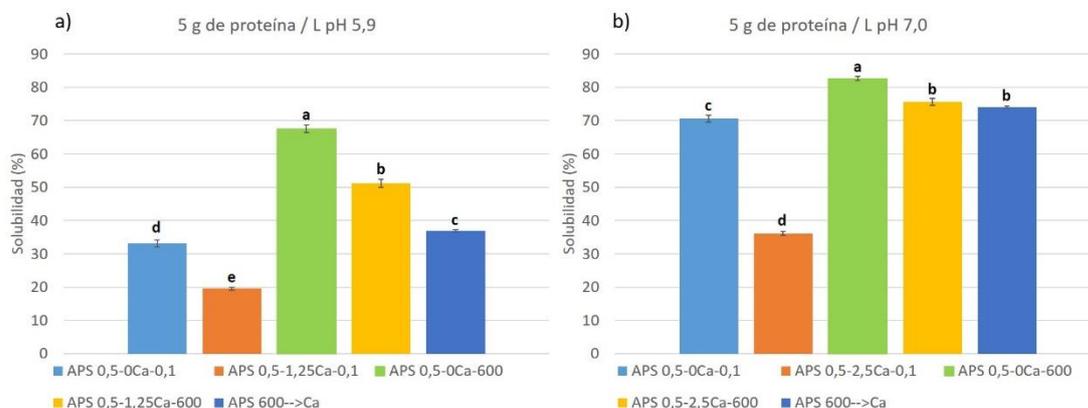
Concentración de proteína (g.L <sup>-1</sup> )	Concentración de calcio incorporado (mmol.L <sup>-1</sup> )	pH	Nivel de presión (MPa)	Nomenclatura
5	0	5,9	0,1	APS <sub>0,5</sub> -0Ca - pH5,9 - 0,1
5	0	5,9	600	APS <sub>0,5</sub> -0Ca - pH5,9 - 600
5	1,25	5,9	0,1	APS <sub>0,5</sub> -1,25Ca - pH5,9 - 0,1
5	1,25	5,9	600	APS <sub>0,5</sub> -1,25Ca - pH5,9 - 600
5	0	7,0	0,1	APS <sub>0,5</sub> -0Ca - pH7,0 - 0,1
5	0	7,0	600	APS <sub>0,5</sub> -0Ca - pH7,0 - 600
5	2,5	7,0	0,1	APS <sub>0,5</sub> -2,5Ca - pH7,0 - 0,1
5	2,5	7,0	600	APS <sub>0,5</sub> -2,5Ca - pH7,0 - 600
10	0	5,9	0,1	APS <sub>1</sub> -0Ca - pH5,9 - 0,1
10	0	5,9	600	APS <sub>1</sub> -0Ca - pH5,9 - 600
10	2,5	5,9	0,1	APS <sub>1</sub> -2,5Ca - pH5,9 - 0,1
10	2,5	5,9	600	APS <sub>1</sub> -2,5Ca - pH5,9 - 600
10	0	7,0	0,1	APS <sub>1</sub> -0Ca - pH7,0 - 0,1
10	0	7,0	600	APS <sub>1</sub> -0Ca - pH7,0 - 600
10	5	7,0	0,1	APS <sub>1</sub> -5Ca - pH7,0 - 0,1
10	5	7,0	600	APS <sub>1</sub> -5Ca - pH7,0 - 600

En la tabla se especifica la concentración de proteína utilizada en cada dispersión (g.L<sup>-1</sup>), la concentración de calcio adicionada (mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>), el pH final ajustado luego de la incorporación de calcio y el nivel de presión utilizado en los tratamientos con APH (MPa).

### 2.3.1. Caracterización fisicoquímica de dispersiones de APS utilizadas para preparar emulsiones o/w

#### 2.3.1.1. Determinación de solubilidad proteica

Los valores de solubilidad proteica se muestran en la Figura II.12.



**Figura II.12. Porcentaje de proteína soluble en dispersiones de APS 5 g proteína L<sup>-1</sup> a pH 5,9 (panel a)) y pH 7,0 (panel b)). La barra azul corresponde a las muestras en las cuales la adición de CaCl<sub>2</sub> se realizó con posterioridad al tratamiento con APH. Letras diferentes dentro de cada valor de pH indican diferencias significativas (test de Tukey, p<0,05).**

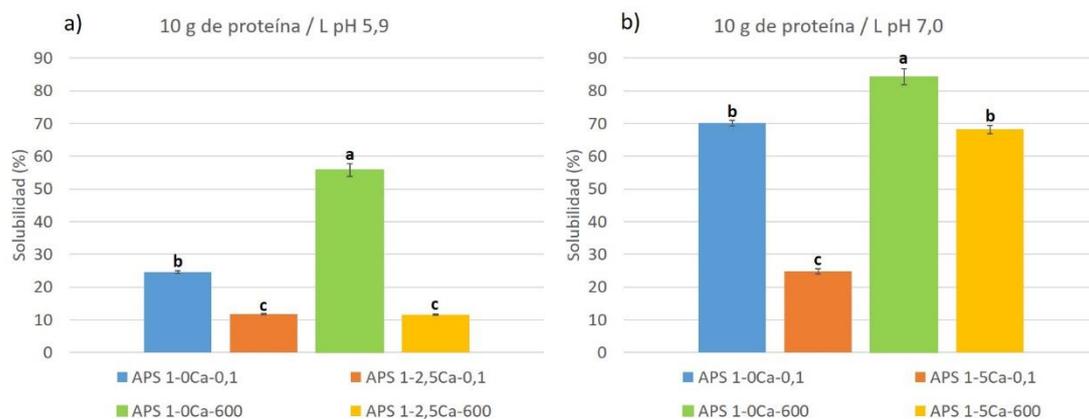
Las dispersiones de APS presentaron mayor solubilidad a pH 7,0 que a pH 5,9, lo cual era esperable debido a la mayor proximidad de las proteínas de soja a su punto isoeléctrico *ca.* 4,5 en el caso de pH 5,9 (Koshiyama, 1968; Kella, Barbeau & Kinsella, 1986). El agregado de CaCl<sub>2</sub> disminuyó el porcentaje de proteína soluble a ambos valores de pH, siendo mayor el efecto relativo a pH 7,0, probablemente por la mayor concentración de CaCl<sub>2</sub> incorporada a las muestras a este pH. No obstante, el porcentaje de proteína soluble luego del agregado de CaCl<sub>2</sub> fue mayor a pH 7,0 que a 5,9 (36,1 *vs.* 19,5 %, respectivamente). La precipitación normalmente comienza luego de alcanzar un cierto valor umbral en la concentración de iones Ca<sup>+2</sup>. Este umbral a su vez es fuertemente dependiente de las características que presenten las proteínas de soja, siendo mayor cuanto más soluble sea la misma (Yuan *et al.* 2002).

El tratamiento con APH incrementó el porcentaje de proteína soluble en todas las muestras estudiadas. En presencia de calcio, el incremento relativo en el porcentaje de proteína soluble (IS%) fue de 162 % a pH 5,9 y de 109 % a pH 7,0. A fin de estudiar el efecto del orden de agregado del calcio (antes o después del tratamiento con APH) se estudió su incorporación con posterioridad al tratamiento. En este caso el porcentaje de proteína soluble a pH 5,9 fue mayor que en las muestras APS<sub>0,5-1,25Ca-pH5,9-0,1</sub>, pero

menor que en las muestras APS<sub>0,5-1,25Ca-pH5,9-600</sub> en la cual el calcio estuvo presente durante el tratamiento. Sin embargo, a pH 7,0 no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de proteína soluble debidas a la presencia del calcio durante o posterior al tratamiento con APH. Esto indicaría que la presencia o ausencia de calcio durante el tratamiento con APH afecta las características de las dispersiones a pH 5,9 y sugiere que los mecanismos inducidos o las estructuras formadas por APH difieren entre pH 5,9 y 7,0, con la presencia de calcio durante el tratamiento.

Es interesante resaltar que APS<sub>0,5-1,25Ca-pH5,9-600</sub> tuvo mayor solubilidad que APS<sub>0,5-0Ca-pH5,9-0,1</sub>, ocurriendo lo mismo para el par APS<sub>0,5-2,5Ca-pH7,0-600</sub> y APS<sub>0,5-0Ca-pH7,0-0,1</sub>. Esto indica que en estas condiciones el tratamiento con APH permite simultáneamente adicionar con calcio y mejorar la solubilidad proteica con respecto a las muestras sin calcio ni tratamiento desnaturizante.

En la Figura II.13. se muestra el porcentaje de proteína soluble en dispersiones de APS 10 g de proteína.L<sup>-1</sup>.



**Figura II.13. Porcentaje de proteína soluble en dispersiones de APS 10 g proteína L<sup>-1</sup> a pH 5,9 (panel a) y pH 7,0 (panel b)). Letras diferentes dentro de cada valor de pH indican diferencias significativas (test de Tukey, p<0,05).**

El porcentaje de proteína soluble en las dispersiones de APS a pH 7,0 fue mayor que a pH 5,9 para todas las muestras estudiadas. El agregado de calcio produjo una disminución de la solubilidad proteica a ambos valores de pH, siendo nuevamente el efecto relativo mayor a pH 7,0, aunque el valor de la misma fue mayor que a pH 5,9 (24,8 % vs. 11,8 %). Estos resultados son similares a los obtenidos dispersando el APS en agua bidestilada (Capítulo I, sección 1.2.3.) y en *buffers* a 5 g de proteína.L<sup>-1</sup>. Sin embargo, en los ensayos descritos en el Capítulo I, realizados en agua bidestilada y a 10 g de proteína.L<sup>-1</sup>, el agregado de calcio a pH 5,9 no produjo disminución del porcentaje de proteína soluble, a

pesar de haber sido constante la relación calcio/proteína en ambos ensayos. Esta diferencia puede estar asociada a la presencia del *buffer* BIS-TRIS en las dispersiones. Durante el tratamiento con APH se producen descensos transitorios de pH que afectan el proceso de desnaturalización proteica. La magnitud de estos descensos, además del nivel de presión, dependería de la composición del medio (Samaranayake & Sastry, 2013).

El tratamiento con APH incrementó el porcentaje de proteína soluble en las muestras sin agregado de calcio a ambos valores de pH. Sin embargo, en presencia de calcio no se encontró efecto del tratamiento con APH en las muestras APS<sub>1-2,5Ca-pH5,9-600</sub>, mostrando una diferencia con lo observado en las muestras APS<sub>0,5-1,25Ca-pH5,9-600</sub> (Figura II.12. *vs.* Figura II.13.). A pH 7,0 notablemente no se encontró diferencias en el porcentaje de proteína soluble entre las muestras APS<sub>1-5Ca-pH7,0-600</sub> en relación a APS<sub>1-0Ca-pH7,0-0,1</sub>. A su vez, el tratamiento con APH produjo un IS% del 175 % en APS<sub>1-5Ca-pH7,0-600</sub>. Este IS% fue mayor que en las muestras APS<sub>0,5-2,5Ca-pH7,0-600</sub> (109 %) a pesar de que se mantuvo constante la relación calcio/proteína. Estos datos sugieren que la concentración proteica, además del pH, afecta el efecto solubilizante de las APH, notablemente el aumento de la concentración proteica tuvo efectos opuestos: disminución a pH 5,9 y aumento a pH 7,0.

En presencia de calcio (con y sin tratamiento) los porcentajes de solubilidad en las dispersiones 10 g de proteína.L<sup>-1</sup> fueron menores a los correspondientes a igual condición en las dispersiones 5 g de proteína .L<sup>-1</sup>, indicando que las mayores concentraciones proteicas y de calcio promovieron la formación de agregados más insolubles.

#### 2.3.1.2. Determinación de turbidez

En las Figuras II.14. y II.15. se muestran los valores de turbidez (absorbancia a 600 nm) de dispersiones de APS bajo distintas condiciones.

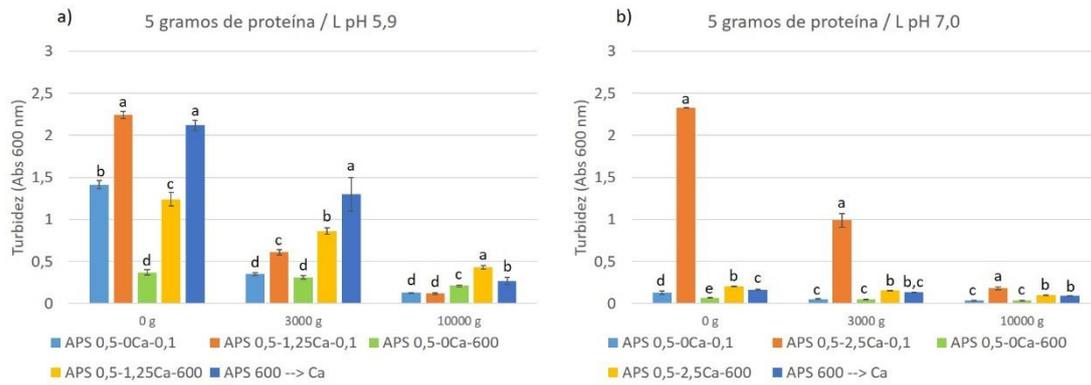


Figura II.14. Turbidez (Absorbancia a 600 nm) de dispersiones de APS 5 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 5,9 (panel a)) y 7,0 (panel b)). Letras diferentes dentro de cada valor de pH y velocidad de centrifugación indican diferencias significativas (test de Tukey, p<0,05).

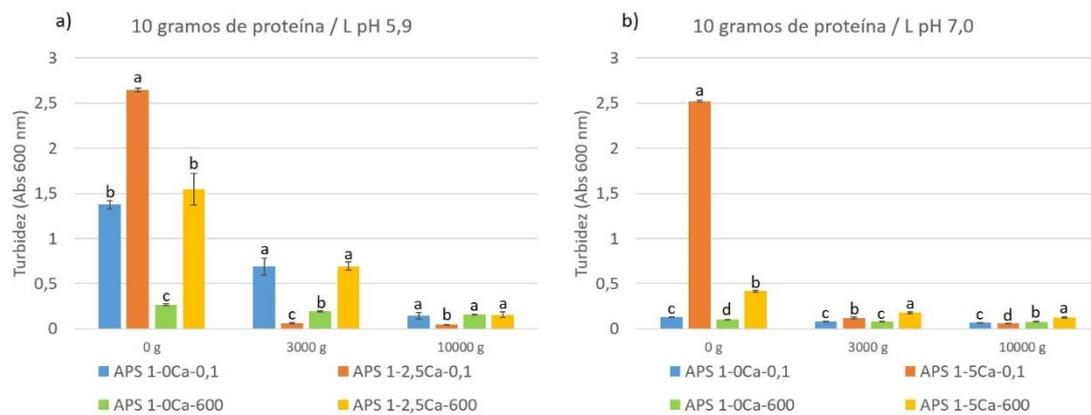


Figura II.15. Turbidez (Absorbancia a 600 nm) de dispersiones de APS 10 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 5,9 (panel a)) y 7,0 (panel b)). Letras diferentes para cada valor de pH y velocidad de centrifugación indican diferencias significativas (test de Tukey, p<0,05).

La turbidez de una dispersión está íntimamente relacionada con el tamaño, concentración e índice de refracción de los coloides (Dezelić, Dezelić & Tezak, 1963). Los valores de absorbancia medidos estuvieron en un rango muy amplio, desde 0,039 ua (APS<sub>0,5-0Ca-pH7,0-600</sub>) hasta 2,647 ua (APS<sub>1-2,5Ca-pH5,9-0,1</sub>). Esto se relaciona con la solubilidad de las proteínas alcanzadas en ambas muestras: la solubilidad fue 82,6 % para la muestra menos turbia y 11,8 % para la más turbia. La centrifugación disminuyó la turbidez por acelerar la sedimentación de las partículas insolubles. A su vez, el aumento de la velocidad de centrifugación (de 3000 a 10000 g) produjo una disminución más pronunciada en la turbidez. Okoth, Kaahwa e Imungi (2000) y Silva *et al.* (2010) trabajaron con jugos de fruta y encontraron que cuanto menor era el tamaño de partículas suspendidas en estas bebidas tanta mayor cantidad de luz pudo atravesar la muestra con la consecuente disminución en los valores de absorbancia.

En las muestras sin centrifugar (0 g) y sin tratar con APH (0,1MPa), la incorporación de calcio aumentó la turbidez de las dispersiones, para las dos concentraciones de proteínas y los dos valores de pH estudiados, con un efecto más importante en las dispersiones de APS 10 g.L<sup>-1</sup>. Swaisgood (1992) y Ye y Singh (2001) también encontraron un aumento en la turbidez, pero en dispersiones de caseína, con el incremento en la concentración de calcio producto de la formación de agregados caseína-calcio. Por su parte, el tratamiento con APH produjo la disminución de la turbidez en las muestras sin calcio y en las que el calcio estuvo presente durante el tratamiento. Este efecto de la APH se verificó a ambos valores de pH (a igual concentración de calcio) y se deberían a los cambios en la solubilidad. Para confirmar lo anterior se analizó la relación entre la turbidez y la solubilidad (Figura II.16.). En las muestras sin centrifugar se encontró una relación inversa entre la turbidez y la solubilidad, que se explica por la abundancia relativa de partículas insolubles dispersas (Figura II.16., panel a)). Notablemente, la muestra APS<sub>1</sub>-2,5Ca-pH5,9-600, en que la que el tratamiento con APH no había aumentado la solubilidad (11,6 %), presentó una turbidez relativamente baja (1,54 ua), similar al control. Si se compara con APS<sub>0,5</sub>-1,25Ca-pH5,9-600, en que el tratamiento con APH sí había aumentado la solubilidad (de 19,5 a 51,1 %) y disminuido la turbidez (de 2,24 a 1,24 ua), se puede hipotetizar que la mayor concentración de proteína y de calcio influyó en el efecto de la APH, que modificó la estructura de los agregados de forma de disminuir la turbidez, pero no indujo la modificación necesaria para aumentar la solubilidad. En diferentes trabajos, se ha descrito que tratamientos a 200 o 300 MPa producen la disminución de la turbidez de muestras de caseína de leche, siendo este efecto de mayor magnitud a presiones entre 400 y 500 MPa (Buchheim *et al.* 1996; Schrader & Buchheim, 1998 y Needs *et al.* 2000). A su vez, Desobry-Banon, Richard y Hardy (1994) encontraron que tratamientos con APH entre 230 y 430 MPa de muestras de leche descremada reconstituida, redujeron el tamaño de partícula, y en consecuencia la turbidez. Por su parte, Kubo, Augusto y Cristianini (2013) encontraron una disminución en la turbidez de sobrenadantes de jugos de tomates directamente proporcional al aumento de presión aplicada en el proceso de homogenización por alta presión, lo cual se debió a una disminución en el tamaño de partícula. A su vez, Ye y Harte (2014) observaron una importante disminución de la turbidez en sistemas acuosos de caseína e hidroxipropilcelulosa homogenizadas por alta presión a 300 MPa, también producido por la disminución en el tamaño de partícula.



En las muestras centrifugadas a 3000 g se observaron valores de absorbancia en un rango menor (Figura II.16., panel b)) y con una distribución independiente de la solubilidad. Algunas condiciones mostraron comportamientos destacables, nuevamente el par APS<sub>1-2,5Ca-pH5,9-0,1</sub> - APS<sub>1-2,5Ca-pH5,9-600</sub> llamó la atención por una importante diferencia en absorbancia (0,063 *vs.* 0,69 ua, respectivamente) (Figura II.15., panel a)), sin diferencias en solubilidad. Esto sugiere que los agregados insolubles formados durante el tratamiento con APH, tienen una mayor estabilidad coloidal que los formados en iguales condiciones de pH y concentraciones de proteína y de calcio a presión atmosférica (0,1 MPa). Ye y Harte (2014) trabajaron con sistemas acuosos de caseína e hidroxipropilcelulosa homogenizados por alta presión a 300 MPa y encontraron una gran estabilidad en el sistema, durante dos semanas de almacenamiento a 4 °C, indicando la formación de agregados cinéticamente estables. Es notable que la muestra APS<sub>1-2,5Ca-pH5,9-0,1</sub> exhibía la mayor turbidez antes de la centrifugación y que luego de esta etapa fuese la que exhibió la menor turbidez. Esto sugiere que el cambio estructural producido por el tratamiento con APH aumentó sensiblemente la estabilidad coloidal, haciendo que una dispersión muy turbia y muy inestable (absorbancia se redujo de 2,647 a 0,063 ua en las no tratadas con APH) se transformase en una menos turbia y más estable (absorbancia se redujo de 1,55 a 0,69 ua en las tratadas con APH) (Figura II.15., panel a)).

Por su parte, APS<sub>0,5-1,25Ca-pH5,9-600</sub>, en la que APH aumentó la solubilidad de 19,5 a 51,1 %, mostró una disminución de turbidez luego de la centrifugación a 3000 g de 1,24 a 0,86 ua (Figura II.14., panel a)). Una absorbancia de 0,86 ua sugiere que una gran parte de la proteína insoluble permaneció en suspensión. La muestra en que el agregado de CaCl<sub>2</sub> se realizó con posterioridad al tratamiento con APH, a igual pH y concentración, también mostró buena estabilidad (la absorbancia luego de la centrifugación fue 1,30 ua) (Figura II.14., panel a)). En este caso la solubilidad solo había aumentado de 19,5 a 36,9 %.

Las muestras centrifugadas a 10000 g fueron muy poco turbias, la mayoría de las muestras tuvo absorbancias menores a 0,2. Las muestras que mostraron mayor estabilidad fueron APS<sub>0,5-1,25Ca-pH5,9-600</sub> y otra de igual composición y pH en la que el calcio fue incorporado con posterioridad al tratamiento con APH (Figura II.14., panel a)). Dado que la determinación de solubilidad se realizó centrifugando a 10000 g, estos resultados indican que en estas muestras parte de lo que se informó como “proteína soluble” está representado por agregados insolubles (generan turbidez porque pertenecen a una fase dispersa) que son cinéticamente estables.

Los ensayos de determinación de turbidez en muestras expuestas a distintas aceleraciones permitieron evidenciar la presencia de especies con estabilidad coloidal aumentada. La combinación de APH e incorporación de calcio modificó los agregados insolubles haciéndolos solubles en muchas de las condiciones estudiadas o bien mejorando su estabilidad coloidal. En las muestras a pH 5,9 en que la insolubilización se debe tanto a la incorporación de calcio como a la proximidad con el punto isoeléctrico, el efecto más evidente fue el aumento de estabilidad, mientras que en las muestras a pH 7,0 el efecto más evidente fue la solubilización.

### 2.3.1.3. Determinación del potencial- $\zeta$

Como se indicó en materiales y métodos sección 2.2.1.8, la determinación de potencial- $\zeta$  requiere que las muestras se encuentren en un medio de baja conductividad para evitar que los sucesivos procesos de medición dañen la muestra y/o los electrodos de la celda. La presencia de los *buffers* generó una alta conductividad. Las muestras fueron diluidas para disminuir este efecto. Dada la necesidad de diluir (dilución aproximada 1/2) se decidió trabajar únicamente con las dispersiones 5 g de proteína.L<sup>-1</sup>. Los resultados se muestran en la Figura II.17.

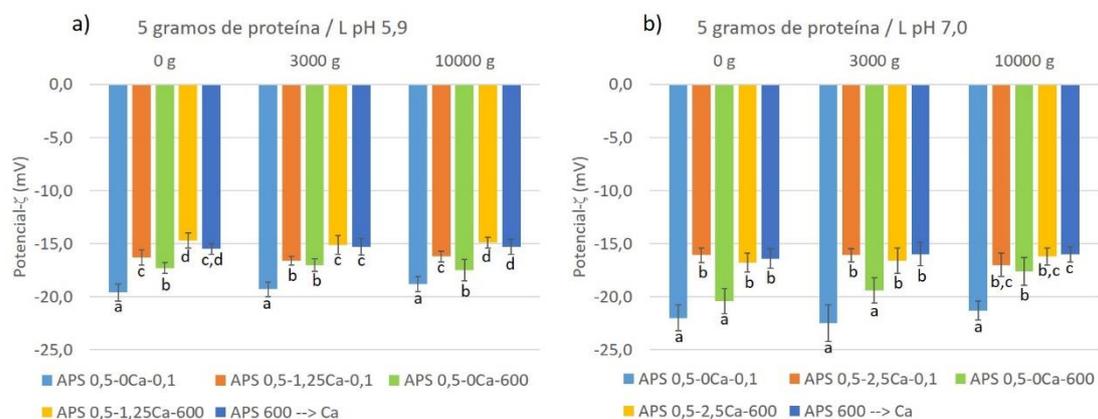


Figura II.17. Potencial- $\zeta$  de dispersiones de APS 5 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 5,9 (panel a)) y 7,0 (panel b)). Letras diferentes dentro de cada valor de pH y velocidad de centrifugación indican diferencias significativas (test de Tukey, p < 0,05).

El mayor valor absoluto del potencial- $\zeta$  se detectó en muestras sin calcio a pH 7,0. Esto concuerda con lo observado en los ensayos realizados a una concentración de 10 g de proteína.L<sup>-1</sup> en agua bidestilada (Capítulo I, sección 1.2.4.). Sin embargo, los valores absolutos del potencial- $\zeta$  de las proteínas dispersadas en *buffers* fueron menores que en los

casos de muestras dispersadas en agua bidestilada, esto podría deberse a una unión de la forma protonada de los *buffers* con las cargas negativas de las proteínas, produciendo un apantallamiento. La presencia de calcio redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) el potencial- $\zeta$  en las muestras correspondientes a ambos valores de pH, por neutralización parcial de las cargas negativas de la superficie proteica. Liu *et al.* 2011 encontraron que la adición de  $\text{CaCl}_2$  a dispersiones de glicinina afectó el perfil de potencial- $\zeta$  en función del pH, disminuyendo significativamente a medida que se aumentó la concentración de  $\text{CaCl}_2$ .

El tratamiento con APH disminuyó el valor absoluto del potencial- $\zeta$  en las muestras sin calcio. A pH 5,9 esta disminución fue significativa ( $p < 0,05$ ) en las muestras centrifugadas o sin centrifugar, mientras que a pH 7,0 la disminución fue significativa ( $p < 0,05$ ) en las muestras centrifugadas a 10000 g. Notablemente, el efecto de APH en *buffer* a pH 5,9 fue disminuir el potencial- $\zeta$  y aumentar la solubilidad, mientras que en agua bidestilada (Capítulo I, secciones 1.2.3 y 1.2.4) no hubo cambio en el potencial- $\zeta$  ni en la solubilidad. Este resultado, en principio contradictorio (disminución de potencial- $\zeta$  acompañado de aumento de solubilidad) sugeriría un mecanismo complejo, por ejemplo, un grado aumentado de unión *buffer* protonado-proteína que dificultaría la interacción proteína-proteína por un factor estérico, disminuyendo la agregación e insolubilización. Esta hipótesis se podría demostrar con la ayuda de otros experimentos que no fueron realizados en el presente trabajo.

En presencia de calcio, el tratamiento con APH disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) el valor absoluto del potencial- $\zeta$  a pH 5,9 pero no a pH 7,0. En el caso de pH 5,9 aparece nuevamente una diferencia del efecto del tratamiento con APH sobre el potencial- $\zeta$ , dependiendo de si el tratamiento se realizó en *buffer* (disminución) o en agua bidestilada (sin cambios). Este fenómeno podría explicarse como en el caso anterior por un aumento en el grado de unión *buffer* protonado-proteína.

La centrifugación afectó poco los comportamientos, probablemente debido a que las especies con carga serían más estables, mientras que las especies sin carga precipitarían con mayor facilidad cuando son aceleradas (Genovese & Lozano, 2001; McClements, 2005), y no aportan al potencial- $\zeta$ . Sin embargo, las muestras con menor valor absoluto de potencial- $\zeta$ , que se obtuvieron a pH 5,9, tratadas con APH y con calcio (incorporado antes o después del tratamiento), habían sido las de mayor estabilidad coloidal (Figura II.14., panel a)). Esto indica que otros factores además del potencial- $\zeta$  gobiernan la estabilidad coloidal.

#### 2.3.1.4. Análisis de distribución de tamaño de agregados

En la Figura II.18. se muestran las distribuciones de tamaño de agregados obtenidas por análisis de dispersión de luz dinámica en las dispersiones de APS 5 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 5,9. Las muestras tuvieron distintas distribuciones en un rango amplio de tamaños, arbitrariamente se denominan en este trabajo “agregados pequeños” a las especies con tamaños entre 20 y 300 nm, “agregados medianos” a las que presentaron tamaños en el rango 300 - 2500 nm y “agregados grandes” a las especies de tamaño mayor a 2500 nm.

Las dispersiones APS<sub>0,5</sub>-0Ca-pH5,9-0,1 resultaron heterogéneas en cuanto a la distribución del tamaño de los agregados, encontrándose 3 poblaciones a 188 (la más abundante), 1401 y 4532 nm. La incorporación de calcio (APS<sub>0,5</sub>-1,25Ca-pH5,9-0,1) promovió la formación de agregados de mayor tamaño (246 y 1862 nm), e indujo un aumento en la abundancia de los agregados más grandes (Figura II.18. panel a)). Liu *et al.* (2011) encontraron que la adición de calcio a dispersiones de globulinas de soja a pH 5,8 indujo la agregación tanto de glicinina como β-conglicinina. Los autores atribuyeron este comportamiento a una reducción significativa del valor del potencial-ζ, produciendo un debilitamiento en las fuerzas repulsivas entre moléculas. La centrifugación de ambas muestras disminuyó (3000 g) o hizo desaparecer (10000 g) las poblaciones de los “agregados medianos” y “grandes” (Figura II.18., paneles b) y c)).

El tratamiento con APH de las dispersiones APS<sub>0,5</sub>-0Ca-pH5,9-600 y APS<sub>0,5</sub>-1,25Ca-pH5,9-600 redujo el tamaño de los agregados, homogeneizando la distribución de tamaño de los mismos por disminución o desaparición de los “agregados medianos” y “grandes” (Figura II.18., panel d)). Añón, de Lamballerie y Speroni (2012) trabajaron con dispersiones de APS y fracciones enriquecidas en glicinina o β-conglicinina adicionadas con calcio. Los autores encontraron, analizando por cromatografía de exclusión molecular, que la aplicación de APH producía la ruptura de agregados de gran tamaño en otros más pequeños, siendo el efecto dependiente de la concentración de calcio y de la presión aplicada. Tang y Ma (2009) hallaron que el tratamiento con APH a 600 MPa durante 15 min a 25 ± 2 °C de dispersiones de APS a pH 7,4 producía un incremento en la cantidad de agregados solubles formados a partir de agregados insolubles de mayor tamaño. Adicionalmente encontraron una disminución en la polidispersidad de los agregados solubles, generando una distribución más homogénea.

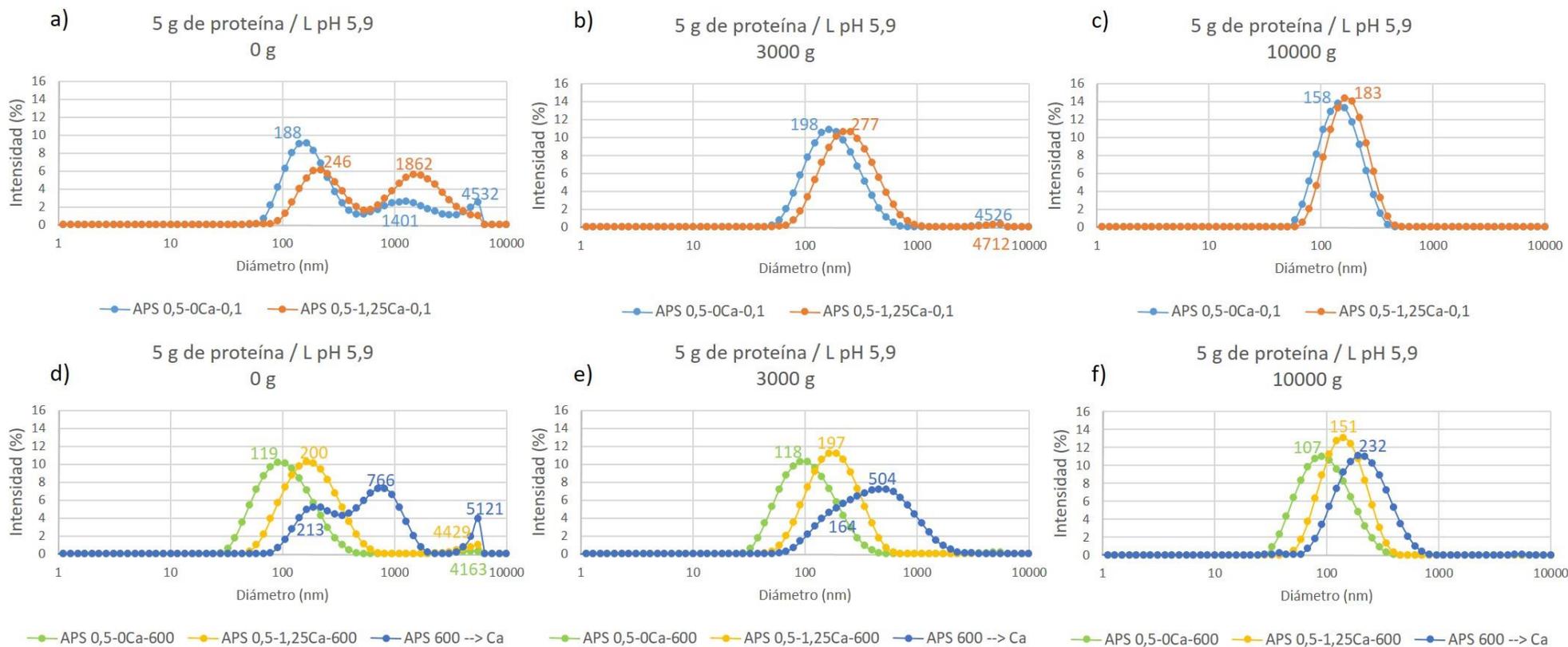


Figura II.18. Distribución de tamaño de agregados correspondientes a dispersiones de APS 5 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 5,9. Los paneles a), b) y c) corresponden a muestras sin tratamiento con APH (0,1 MPa), mientras que los paneles d), e) y f) corresponden a las muestras tratadas con APH (600 MPa). Los valores sobre las curvas indican las modas de las poblaciones en nm.

Cuando el calcio fue agregado con posterioridad al tratamiento con APH se obtuvieron muestras cuya distribución de tamaño de agregados mostró tres poblaciones (213, 766 y 5121 nm) (Figura II.18., panel d)). La centrifugación (3000 y 10000 g) (figura II.18., paneles e) y f)) eliminó las poblaciones de agregados grandes. En el caso de la muestra en la que el calcio se incorporó luego del tratamiento con APH, la centrifugación a 3000 g generó dos poblaciones solapadas con máximos a 164 y 504 nm. Probablemente estos “agregados medianos” fueron los responsables de la alta turbidez detectada en esta muestra (Figura II.14., panel a)). Luego de centrifugar a 10000 g la distribución fue monomodal y con el máximo a 232 nm (Figura II.18., panel f)).

A pH 7,0 se observaron menores tamaños de agregados que a pH 5,9. En  $APS_{0,5}-0Ca-pH7,0-0,1$  hubo especies con un máximo en 27 nm que corresponderían a globulinas no agregadas y otras especies de tamaños mayores. Sponton *et al.* (2015) analizando las distribuciones de tamaño de agregados de ovoalbúmina informaron que en la proximidad al punto isoeléctrico se formaban agregados de escala micrométrica, mientras que al alejarse del punto isoeléctrico los agregados eran de escala nanométrica. Estos autores justificaron ese hallazgo en función de la disminución o aumento de la repulsión electrostática entre polipéptidos. La incorporación de calcio promovió la formación de “agregados medianos” (324 y 2041 nm) (Figura II.19., panel a)). La centrifugación en las muestras sin calcio generó la disminución o desaparición de “agregados grandes”. En las muestras con calcio la centrifugación eliminó los agregados de 2041 nm. Los agregados remanentes, de 371 y 4687 nm (3000 g) y de 245 nm (10000 g) serían los responsables de la mayor turbidez que presentaron estas muestras con respecto a las restantes con igual velocidad de centrifugación (Figura II.14, panel b) y Figura II.19, paneles b) y c)).

El tratamiento con APH de  $APS_{0,5}-0Ca-pH7,0-600$  produjo la aparición de un pico mayoritario y de tamaño intermedio (69 nm) entre los dos mayoritarios de  $APS_{0,5}-0Ca-pH7,0-0,1$  (Figura II.19., paneles a) y d)). Esto indicaría que las globulinas libres se agregaron y los agregados de 158 nm se desensamblaron. Este fenómeno de agregación y disociación fue también informado por Añón, de Lamballerie y Speroni (2012) en muestras de APS a pH 8,0. En el mismo sentido, pero en un sistema diferente, Huppertz, Kelly y de Kruif (2006) encontraron que tratamientos con niveles de presión entre 200 y 400 MPa produjeron la disrupción de micelas de caseína, siendo el efecto de mayor magnitud cuanto más elevado era el nivel de presión aplicado.

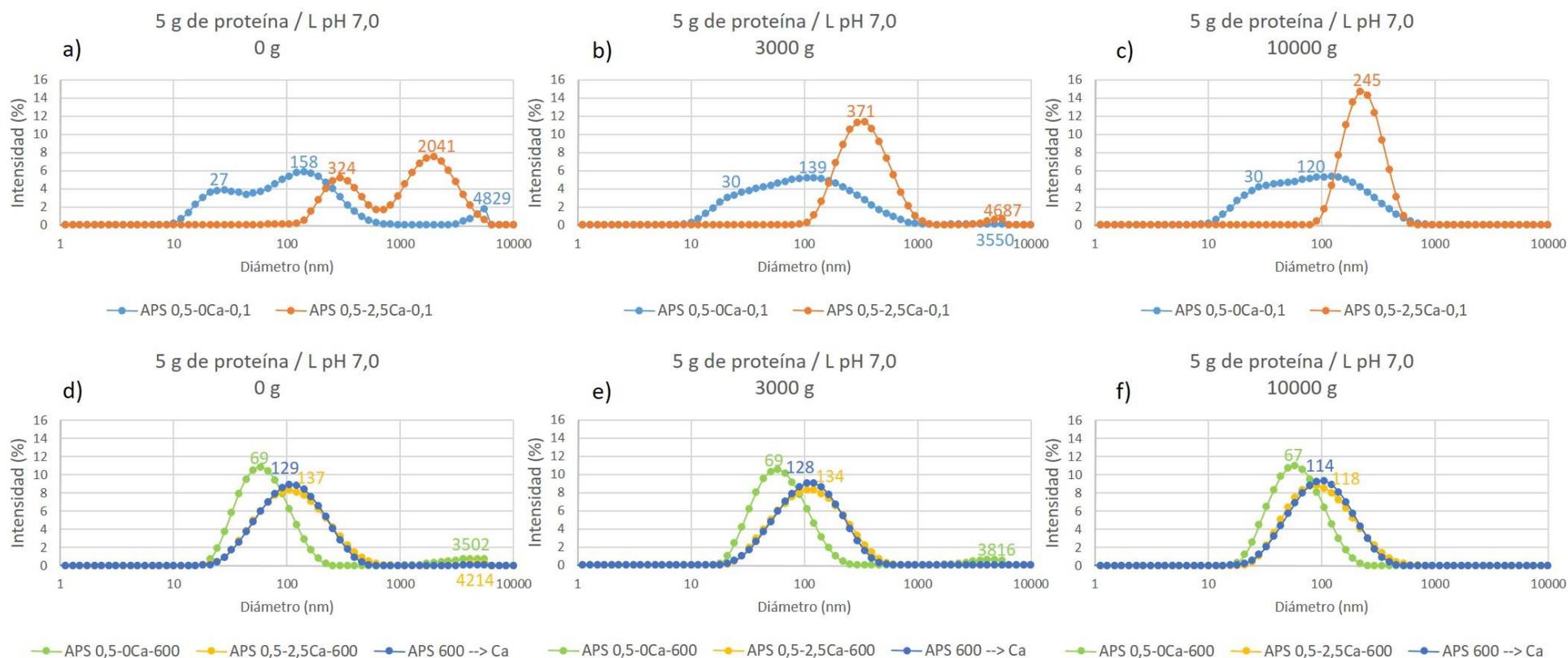
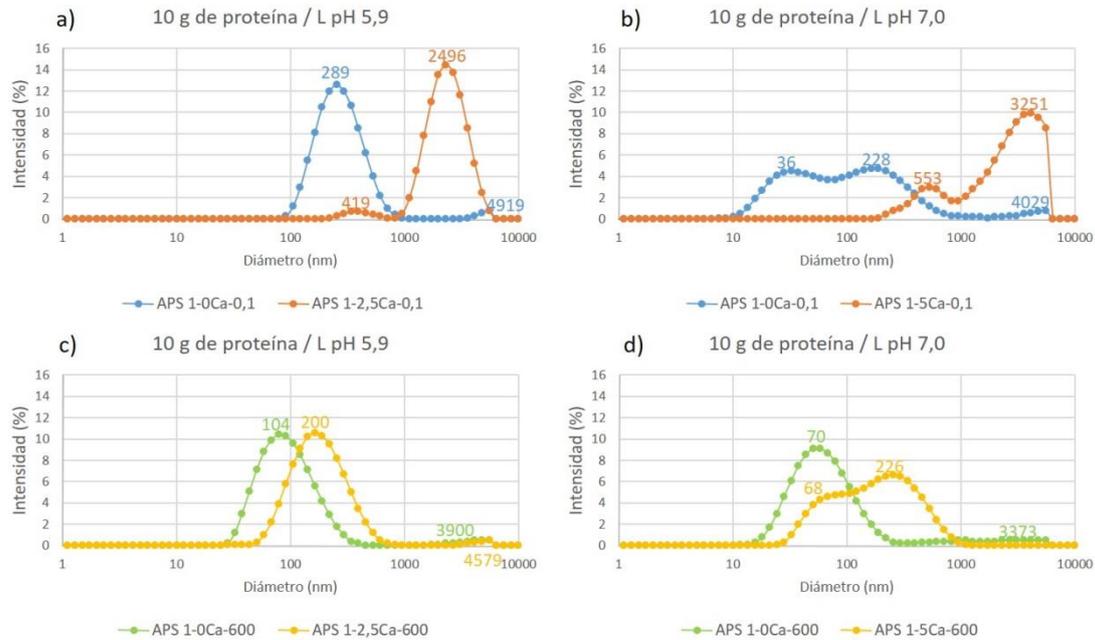


Figura II.19. Distribución de tamaño de agregados correspondientes a dispersiones de APS 5 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 7,0. Los paneles a), b) y c) corresponden a muestras sin tratamiento con APH (0,1 MPa), mientras que los paneles d), e) y f) corresponden a las muestras tratadas con APH (600 MPa). Los valores sobre las curvas indican las modas de las poblaciones en nm.

En las muestras con calcio, incorporado antes o después del tratamiento, se generó una población mayoritaria de 137 y 129 nm respectivamente (Figura II.19., panel d)). Es notable la diferencia de comportamiento con respecto al orden de incorporación de calcio y tratamiento con APH entre los pHs 5,9 y 7,0. A pH 5,9 la incorporación de calcio posterior al tratamiento con APH generó “agregados medianos” y “grandes”, mientras que a pH 7,0 los agregados fueron “pequeños”. Este efecto explicaría las diferencias encontradas en solubilidad: a pH 5,9 la solubilidad aumentaba menos cuando el calcio se añadía luego del tratamiento, mientras que a pH 7,0 el orden no modificaba la magnitud del aumento de solubilidad (Figura II.12.). Notablemente, las dispersiones a pH 7,0 con calcio incorporado antes o después del tratamiento con APH exhibieron distribuciones casi iguales (con y sin centrifugación) a pesar de haberse obtenido de manera diferente. Este comportamiento no se observó a pH 5,9. La centrifugación en las tres muestras que sufrieron tratamiento con APH apenas eliminó unas poblaciones poco abundantes de “agregados grandes” pero casi no modificó las poblaciones de “agregados pequeños” (Figura II.19. paneles e) y f)). Este resultado indica que a pH 7,0 las especies generadas con APH con o sin calcio tienen una estabilidad coloidal muy buena, lo que se reflejó también como leves cambios en la turbidez luego de centrifugar (Figura II.14. panel b)) y altos valores de solubilidad (Figura II.12.).

Se caracterizaron también las muestras 10 g de proteína.L<sup>-1</sup> (Figura II.20.). Las dispersiones APS<sub>1</sub>-0Ca-pH5,9-0,1 presentaron menor heterogeneidad en cuanto a la distribución de tamaños que APS<sub>0,5</sub>-0Ca-pH5,9-0,1. A pH 7,0 los perfiles de las muestras sin calcio ni tratamiento con APH fueron similares a ambas concentraciones proteicas. A ambos valores de pH las modas de las poblaciones fueron mayores en las dispersiones de mayor concentración.

La incorporación de calcio produjo la formación de “agregados medianos” y “grandes”, que tuvieron mayores tamaños que sus correspondientes en las dispersiones 5 g de proteína.L<sup>-1</sup>. En el caso de APS<sub>1</sub>-2,5Ca-pH5,9-0,1 la determinación se pudo realizar luego de haber separado partículas groseras por decantación y diluido la muestra debido a que en las condiciones originales el equipo no lograba generar reportes aceptables debido a la gran polidispersidad y alta turbidez. Esto implica que en la distribución de la Figura II.20., panel a) no aparezcan agregados muy grandes que formaban parte de la dispersión.



**Figura II.20.** Distribución de tamaño de agregados correspondientes a dispersiones de APS 10 g de proteínas.L<sup>-1</sup> a pH 5,9 (paneles a) y c)) y 7,0 (paneles b) y d)). Los paneles a) y b) corresponden a las muestras sin tratamiento con APH (0,1 MPa), mientras que los paneles c) y d) corresponden a las muestras tratadas con APH (600 MPa). Los valores sobre las curvas indican las modas de las poblaciones en nm.

El tratamiento con APH de las dispersiones 10 g de proteína.L<sup>-1</sup>, sin agregado de calcio, a ambos valores de pH, produjo el mismo efecto que en las dispersiones de menor concentración proteica: disminución del tamaño de los agregados y una homogeneización en cuanto a su distribución. Sin embargo, en las muestras APS<sub>1-5Ca</sub>-pH7,0-600 se observaron dos poblaciones parcialmente solapadas (68 y 226 nm) (Figura II.20., panel d)) mientras que en APS<sub>0,5-2,5Ca</sub>-pH7,0-600 se observó una población mayoritaria centrada en una moda de 137 nm (Figura II.19., panel d)). La mayor concentración de proteína y calcio produjo la formación de agregados de mayor tamaño. En el caso de APS<sub>1-2,5Ca</sub>-pH5,9-600 también se requirió separar partículas groseras, por lo que la distribución presentada en la Figura II.20., panel c) representa solo una fracción de la muestra, que fue similar a APS<sub>0,5-1,25Ca</sub>-pH5,9-600 (Figura II.18., panel d)).

Los ensayos de dispersión de luz dinámica permitieron detectar que el tratamiento con APH promovió la disociación de “agregados medianos” y “grandes” para generar especies de tamaño “pequeño”, entre 69 y 226 nm, en las muestras estudiadas sin calcio o con calcio presente durante el tratamiento con

APH. La incorporación del calcio luego del tratamiento con APH mostró diferencias con la incorporación previa a pH 5,9 pero no a pH 7,0.

El efecto solubilizante del tratamiento con APH observado en el presente Capítulo y en el Capítulo I estaría al menos en parte relacionado con la disminución del tamaño de los agregados. La muestra en que la aplicación de APH no logró disminuir el tamaño de los agregados (APS<sub>1-2,5Ca-pH5,9-600</sub>) tampoco tuvo aumento de solubilidad. El efecto del orden (incorporación de calcio – tratamiento con APH) observado a pH 5,9 en la solubilidad tuvo un correlato en el tamaño de los agregados, mientras que a pH 7,0 el cambio del orden no tuvo efecto en la solubilidad ni en el tamaño de los agregados.

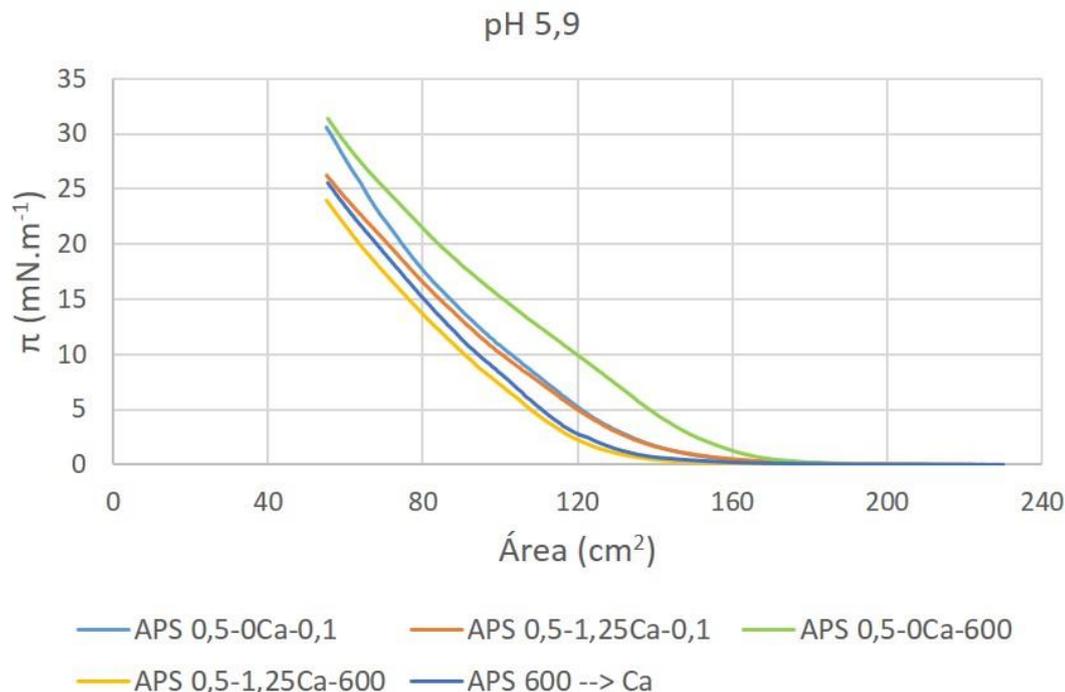
El tratamiento con APH generó especies solubles e insolubles con alta estabilidad coloidal en muestras con y sin calcio.

El aumento de la concentración proteica y de calcio generó agregados de mayor tamaño antes y después del tratamiento con APH a ambos valores de pH.

#### 2.3.1.5. Curvas de presión superficial en la balanza de Langmuir: adsorción en interfase aire/líquido

##### 2.3.1.5.1. A pH 5,9

En la Figura II.21. se muestran las curvas de presión superficial ( $\pi$ ) en función del área a pH 5,9 correspondientes a la siembra de 16  $\mu\text{g}$  de proteína de los diferentes sobrenadantes (10000 g, 20 min, 4 °C) obtenidos a partir de las dispersiones de APS 5 g de proteína.L<sup>-1</sup>.



**Figura II.21.** Curvas de presión superficial en función del área a pH 5,9 en la interfase aire/líquido para distintos sobrenadantes de muestras de APS sembradas en la balanza de Langmuir.

La muestra APS<sub>0,5-0Ca-pH5,9-600</sub> mostró la mayor eficiencia para aumentar la presión superficial. La incorporación de calcio afectó negativamente la actividad superficial de las proteínas de APS, obteniendo valores de  $\pi$  menores que las dispersiones sin calcio al final de la experiencia. Al comparar las curvas de APS<sub>0,5-0Ca-pH5,9-600</sub> y de APS<sub>0,5-0Ca-pH5,9-0,1</sub> se observó que la diferencia entre ellas disminuyó a medida que el área se redujo, alcanzando prácticamente el mismo valor al final de la experiencia (31,6 *vs.* 30,5 mN.m<sup>-1</sup>, respectivamente). Este comportamiento se debería a cambios en los mecanismos de adsorción o reordenamientos en la interfase, que podrían en parte atribuirse a diferencias en estructura y tamaño de los agregados. La curva correspondiente a APS<sub>0,5-0Ca-pH5,9-600</sub> fue la que más rápido (al comienzo del ensayo) logró aumentar  $\pi$ , probablemente debido al menor tamaño de los agregados (Figura II.18., paneles c) y f)), lo que le permitiría llegar más rápidamente a la interfase (McClements, 2005).

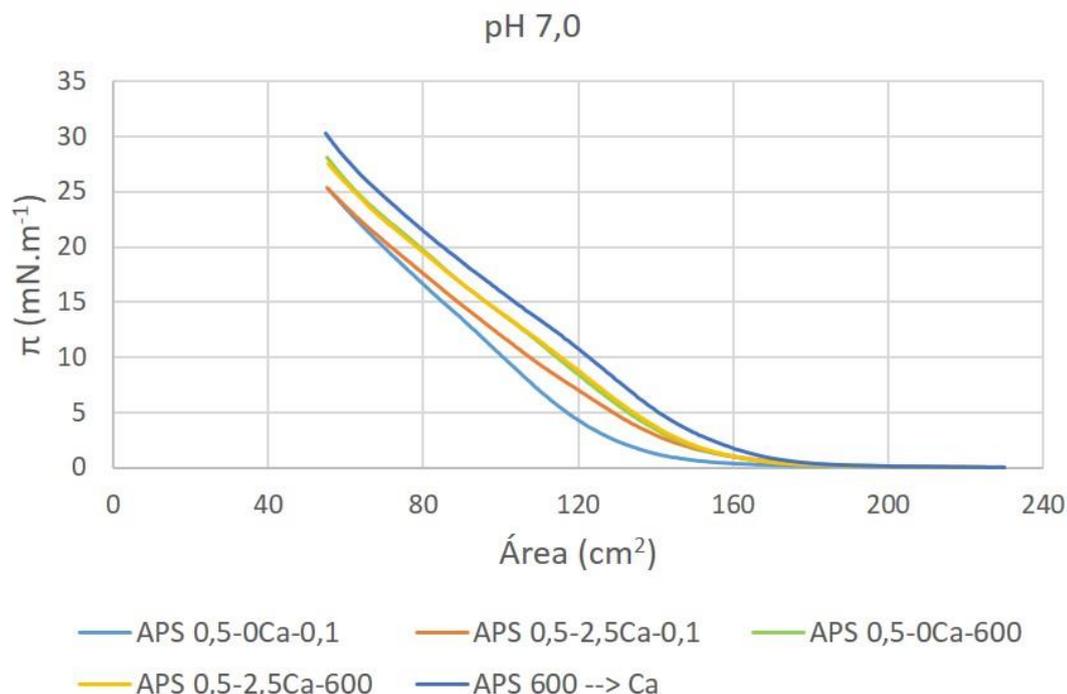
La presencia de calcio disminuyó la actividad interfacial, en relación a las muestras sin incorporación del mismo, en cuanto a los valores de  $\pi$  detectados al final del ensayo. Probablemente los puentes de calcio entre distintas regiones de los polipéptidos limitaron la flexibilidad y disminuyeron la eficacia del empaquetamiento (Camejo, Colacicco & Rapport, 1968). Ye y Singh (2001) llegaron a conclusiones similares trabajando con emulsiones estabilizadas con caseínas y calcio. La curva de APS<sub>0,5-1,25Ca-pH5,9-600</sub> se

mantuvo por debajo del resto durante todo el ensayo y al final del mismo alcanzó un menor valor de  $\pi$  que APS<sub>0,5-0Ca-pH5,9-0,1</sub> y APS<sub>0,5-0Ca-pH5,9-600</sub> ( $p < 0,05$ ).

El tratamiento con APH empeoró la actividad superficial de las dispersiones APS<sub>0,5-1,25Ca-pH5,9-600</sub> en relación a APS<sub>0,5-1,25Ca-pH5,9-0,1</sub>. El agregado de calcio disminuyó la carga superficial de ambas dispersiones, con una disminución más pronunciada en APS<sub>0,5-1,25Ca-pH5,9-600</sub>. Esto podría favorecer el aumento de interacciones atractivas entre agregados proteicos generando estructuras menos flexibles y con menor capacidad de anclarse y reordenarse en la interfase siendo una de las causas posibles de la menor actividad superficial registrada, como sugieren Ye y Singh (2001). Si se compara la  $\pi$  de las muestras APS<sub>0,5-1,25Ca-pH5,9-0,1</sub>; APS<sub>0,5-1,25Ca-pH5,9-600</sub> y aquella en la que el calcio fue adicionado con posterioridad al tratamiento con APH, se encontró una tendencia a que la que mayor  $\pi$  presentó a su vez tuviera la menor turbidez mientras que la que menor  $\pi$  exhibió tuviera la mayor turbidez (Figura II.14., panel a) y Figura II.21.). Si bien las isotermas de adsorción se realizaron con las proteínas presentes en los sobrenadantes de la centrifugación a 10000 g (que corresponde a nuestra definición operacional de “proteína soluble”), la diferencia de turbidez en estas muestras indica la presencia de una fase dispersa. Posiblemente la abundancia relativa de agregados insolubles influyó negativamente en su capacidad tensioactiva en estos ensayos.

#### 2.3.1.5.2. A pH 7,0

En la Figura II.22. se muestran las curvas de presión superficial ( $\pi$ ) en función del área a pH 7,0 correspondientes a la siembra de 16  $\mu\text{g}$  de proteína de los diferentes sobrenadantes (10000 g, 20 min, 4 °C) obtenidos a partir de las dispersiones de APS 5 g de proteína . L<sup>-1</sup>.



**Figura II.22.** Curvas de presión superficial en función del área a pH 7,0 en la interfase aire/líquido para distintos sobrenadantes de muestras de APS sembradas en la balanza de Langmuir.

A este valor de pH las muestras APS<sub>0,5-0Ca-pH7,0-0,1</sub> mostraron la menor actividad superficial en casi todo el rango de área estudiado, alcanzando un valor de  $\pi$  similar al de APS<sub>0,5-2,5Ca-pH7,0-0,1</sub> al final de la experiencia (25,4 vs. 25,3 mN.m<sup>-1</sup>, respectivamente). Sin embargo, el agregado de calcio mejoró la actividad superficial de las muestras APS<sub>0,5-2,5Ca-pH7,0-0,1</sub> en casi todo el rango de áreas ensayadas. Las muestras APS<sub>0,5-0Ca-pH7,0-600</sub> mostraron una mejora significativa ( $p < 0,05$ ) en la actividad superficial en relación a APS<sub>0,5-0Ca-pH7,0-0,1</sub> alcanzando un valor mayor de presión superficial al final del ensayo (28,1 vs. 25,4 mN.m<sup>-1</sup>). A pH 7,0 el tratamiento con APH produjo “agregados pequeños” y mayormente solubles, total o parcialmente desnaturalizados, capaces de difundir y llegar más rápidamente a la interfase y aumentar la presión superficial, pudiendo ser ésta una de las causas de la mejora observada. Más aún, el tratamiento con APH de las muestras con calcio mejoró notablemente su actividad superficial en relación a las muestras APS<sub>0,5-2,5Ca-pH7,0-0,1</sub>, siendo mayor la mejora cuando el calcio fue adicionado con posterioridad al tratamiento con APH. La mejora de la actividad interfacial de las muestras tratadas con APH podría deberse a cambios en la estructura secundaria, con aumento de la fracción correspondiente a estructuras aleatorias (Puppo *et al.* 2004; Alvarez, Ramaswamy & Ismail, 2008), lo que favorecería el empaquetamiento y reordenamiento en la interfase debido a su mayor flexibilidad (Beverung, Radke y Blanch,

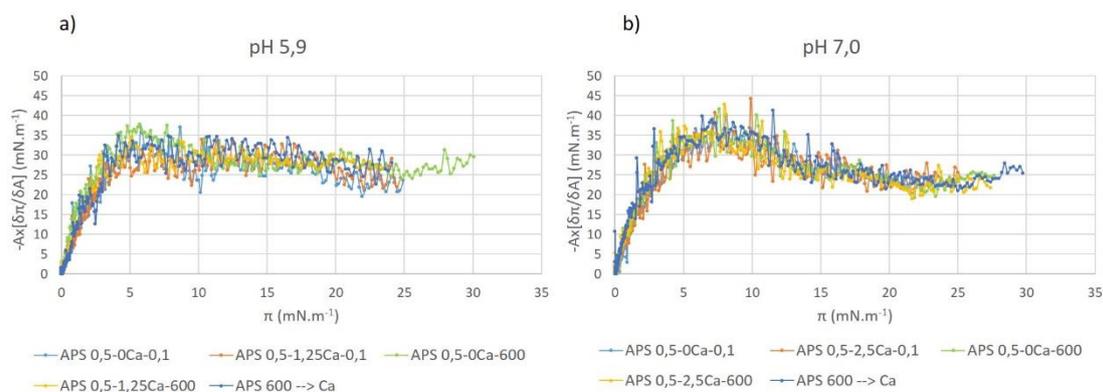
1999). Por otra parte, la explicación de la diferencia observada en la actividad superficial entre las muestras tratadas con APH y adicionadas con calcio, antes o después del tratamiento, es más compleja. Si se analiza el tamaño de los agregados, la solubilidad, el potencial- $\zeta$  y la turbidez de los sobrenadantes obtenidos en ambas condiciones no se encuentran diferencias. Ocurriría que los agregados formados por adición de calcio antes o después del tratamiento con APH, a pesar de las similitudes mencionadas, se diferenciaron en su capacidad de adsorberse y reordenarse en la interfase aire/agua.

### 2.3.1.5.3. Estructura del film interfacial

La derivada de la presión superficial en función del área puede ser considerada como un indicador de la estructura del film interfacial (Pérez *et al.* 2015).

A pH 5,9 las derivadas de  $\pi$  presentaron un punto de inflexión *ca.*  $5,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , para mantenerse constantes hasta *ca.*  $15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , y luego disminuir a mayores valores de  $\pi$ , (Figura II.23., panel a)).

A pH 7,0 las derivadas de  $\pi$  tuvieron un máximo *ca.*  $7,5 - 8,0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , seguido de un descenso hasta *ca.*  $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (Figura II.23., panel b)).



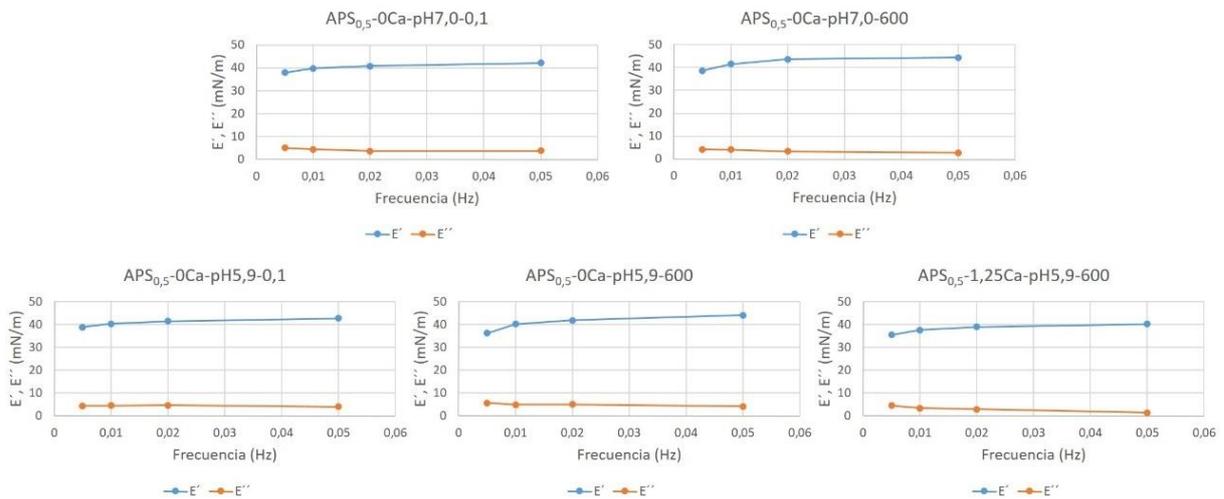
**Figura II.23.** Derivadas de la presión superficial en función del área para distintos sobrenadantes de muestras de dispersiones de APS a pH 5,9 (panel a) y pH 7,0 (panel b)).

Estos resultados sugieren que las proteínas presentes en la fracción soluble generan films interfaciales con estructuras similares a cada pH, sin diferencias entre las condiciones de calcio y tratamiento con APH. Los puntos de inflexión encontrados entre *ca.*  $5,5$  y  $8,0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  indicarían la transición desde una estructura más expandida a una más condensada. Esta transición ocurriría a menores valores de  $\pi$  en las muestras a pH 5,9 que en las de pH 7,0.

### 2.3.1.6. Estudio de la reología interfacial por reología dilatacional

Las propiedades reológicas de un film interfacial influyen en la formación, estabilidad y textura de las emulsiones alimentarias, razón por la cual es importante establecer los factores que afectan la reología interfacial (Bos & van Vliet, 2001). En líneas generales, los emulsificantes que tiendan a producir numerosas interacciones y entrecruzamientos en la interfase, como proteínas globulares y algunos polisacáridos, formaran films con elevados valores de módulo elástico. A su vez, estas interacciones están fuertemente influenciadas por la concentración de emulsificante, la temperatura, el pH y la fuerza iónica (McClements, 2005).

En la Figura II.24. se muestra el comportamiento del módulo elástico ( $E'$ ) y del módulo viscoso ( $E''$ ) en función de la frecuencia de deformación.



**Figura II.24.** Dependencia de los módulos elástico ( $E'$ ) y viscoso ( $E''$ ) con la frecuencia de deformación, a una presión superficial de  $10 \text{ mN.m}^{-1}$ , de los sobrenadantes de APS a una concentración de  $0,001 \text{ g.L}^{-1}$ .

En todas las condiciones ensayadas la componente elástica fue superior a la componente viscosa independientemente de la frecuencia. Esto indica que la capa de proteínas de soja adsorbida en la interfase es principalmente elástica. Como consecuencia de ello el valor del módulo elástico domina la magnitud del módulo viscoelástico ( $E$ ). Comportamientos similares fueron encontrados por Cascão Pereira *et al.* (2003) quienes trabajaron con albúmina de suero bovino a una concentración de  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  a pH 5,0, y por Rodríguez Patino *et al.* (2003) quienes trabajaron con globulinas de soja a diferentes concentraciones a pH 8,0. Con el objetivo de comparar las características viscoelásticas de las muestras se graficó el módulo  $E$  en función de la frecuencia de deformación (Figura II.25.).

Un aumento del valor de E está relacionado con una mayor resistencia de la interfase a la deformación producto de un film interfacial estructurado y rígido, mientras que valores bajos de E están asociados a un film interfacial con poca estructura (Roth, 2001). En todas las muestras se observó una tendencia en el aumento de E con el incremento de la frecuencia de deformación (Figura II.25.).

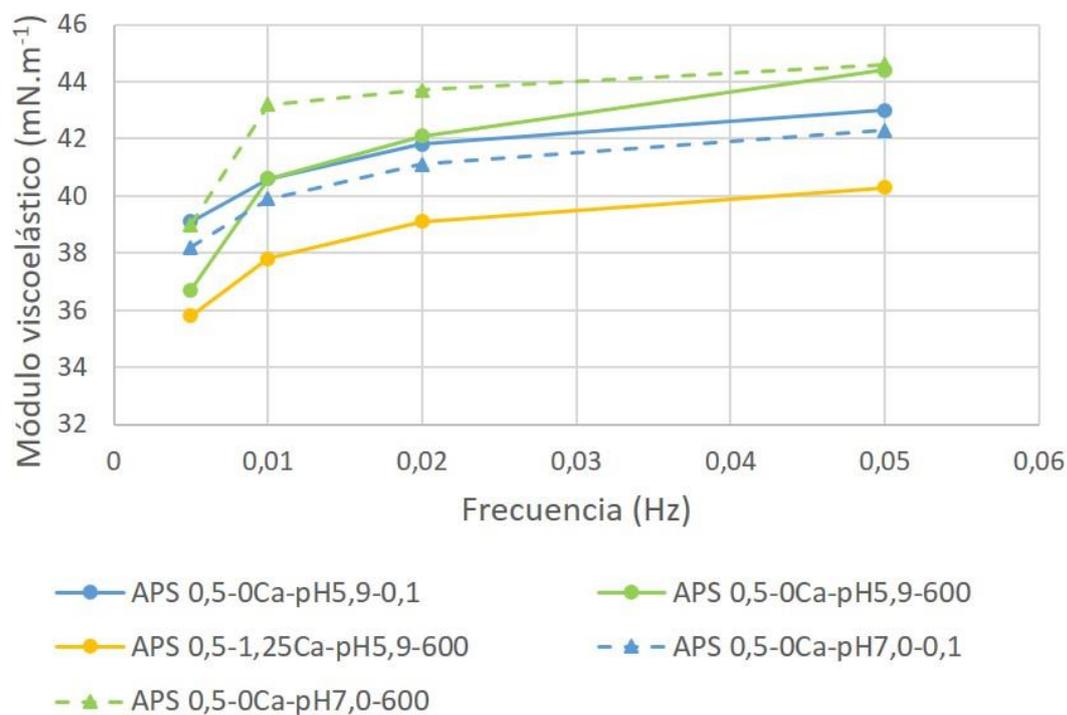


Figura II.25. Dependencia del módulo viscoelástico con la frecuencia de deformación a una presión superficial de  $10 \text{ mN.m}^{-1}$ .

Romero *et al.* (2012) encontraron un incremento en el módulo elástico en función del tiempo asociándolo a un posible desarrollo de interacciones entre proteínas vecinas adsorbidas en la interfase aire/líquido. El mismo comportamiento fue observado por los autores cuando analizaron el módulo elástico en función de la frecuencia de deformación en el equilibrio. Rodríguez Patino *et al.* (2003a) también encontraron un aumento en E en función de la frecuencia de deformación en interfase aire/agua para dispersiones de  $\beta$ -conglucina y glicina a pH 8,0.

Es posible que la dependencia del módulo E con la frecuencia de deformación observada en este Trabajo esté asociada a cambios en la estructura del film interfacial con fuertes interacciones proteína-proteína, lo que podría estar favorecido por el tiempo prolongado empleado en la adsorción de las mismas. Además, comparando valores de E' de estudios similares con otras muestras se encontró que proteínas de carne de cangrejo y de arroz a

10 g.L<sup>-1</sup>, en interfases aceite/agua alcanzaron valores de 40 y 30 mN.m<sup>-1</sup> respectivamente (Romero *et al.* 2011, Romero *et al.* 2012), proteínas de soja a 1 g.L<sup>-1</sup> en interfase aire/agua llegaron a valores *ca.* 50 mN.m<sup>-1</sup> (Rodríguez Patino *et al.* 2003a), mientras que en nuestras muestras de APS a 0,001 g.L<sup>-1</sup> se llegó a valores entre *ca.* 40 y 44 mN.m<sup>-1</sup> (Figura II.25.). Esto sugiere que las globulinas de soja generan films muy estructurados.

Las muestras APS<sub>0,5</sub>-1,25Ca-pH5,9-600 presentaron los valores más bajos de E de todas las muestras ensayadas. Podría decirse entonces que esta muestra es la que presenta la interfase más débil. Esto podría estar relacionado a la baja actividad interfacial observada en los ensayos con la balanza de Langmuir. A su vez, no podría descartarse que estos agregados una vez adsorbidos en la interfase mostraran menor capacidad de interacción entre sí. Según Benjamins, Cagna y Lucassen-Reynders (1996) la disminución de la tensión interfacial, relacionado con el carácter anfifílico y flexibilidad de las moléculas, y la reología interfacial, relacionada con la capacidad que tienen las moléculas adsorbidas en la interfase para interactuar entre sí, pueden ser relacionados. Por otra parte, las muestras APS<sub>0,5</sub>-0Ca-pH7,0-600 produjeron el film interfacial con mayor valor de E, lo que se corresponde con la formación de una interfase rígida y resistente.

**Los ensayos correspondientes a isothermas de adsorción y reología dilatacional, realizados con los sobrenadantes obtenidos luego de la centrifugación a 10000 g, que contuvieron los agregados de menor tamaño, es decir solo una fracción de la muestra, indicaron la formación de films interfaciales estructurados. La muestra APS<sub>0,5</sub>-1,25Ca-pH5,9-600 formaría el film con menor resistencia.**

### 2.3.2. Caracterización de emulsiones o/w

Con las dispersiones caracterizadas en 2.3.1. se formaron emulsiones o/w, que fueron caracterizadas en cuanto a formación y estabilidad.

#### 2.3.2.1. Formación de las emulsiones (tiempo 0). Distribución del tamaño de partícula y microestructura.

##### 2.3.2.1.1. Emulsiones obtenidas a partir de dispersiones de APS 5 g de proteína.L<sup>-1</sup>, pH 5,9

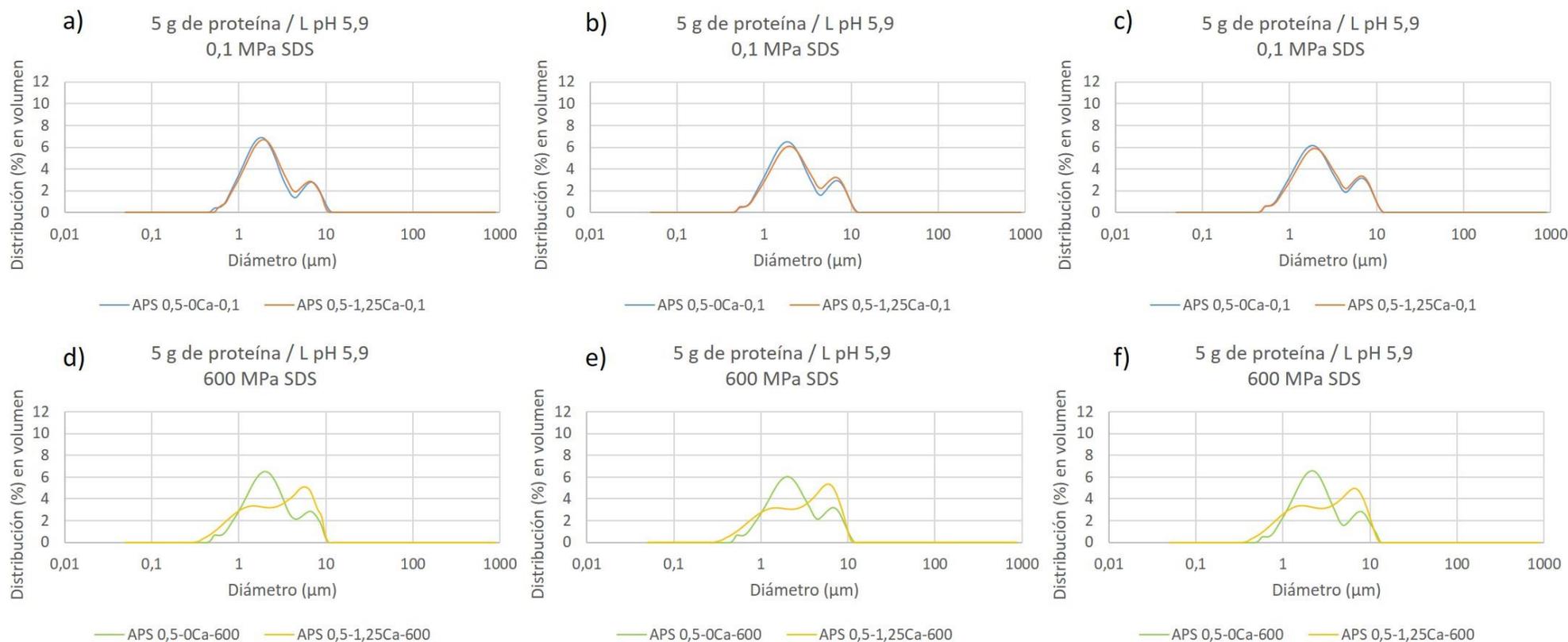
En presencia de SDS las emulsiones obtenidas a partir de las dispersiones APS<sub>0,5</sub>-0Ca-pH5,9-0,1; APS<sub>0,5</sub>-0Ca-pH5,9-600 y APS<sub>0,5</sub>-1,25Ca-pH5,9-0,1 mostraron una distribución de tamaño de gota similar, con una población mayoritaria cuyo diámetro se ubicó alrededor a 2,1 μm (moda) y otra de menor abundancia alrededor de 7,3 μm. A su vez, estas emulsiones mostraron los menores valores de d<sub>4,3</sub> a este valor de pH (Tabla II.4.). La presencia de dos poblaciones en emulsiones recién formadas se debe a la coalescencia de las gotas más pequeñas debido a una baja cantidad de emulsificante. Por otra parte, en las emulsiones obtenidas a partir de las dispersiones APS<sub>0,5</sub>-1,25Ca-pH5,9-600 se invirtió la relación de las poblaciones de gotas, siendo más abundante la población de mayor diámetro producto de un mayor grado de coalescencia (Figura II.26., panel d) y Tabla II.4.).

**Tabla II.4. Valores de diámetro de De Brouckere (d<sub>4,3</sub>) en presencia de SDS para las emulsiones obtenidas a partir de dispersiones 5 g de proteína.L<sup>-1</sup>**

pH		pH 5,9		
Muestras	APS <sub>0,5</sub> -0Ca-0,1	APS <sub>0,5</sub> -1,25Ca-0,1	APS <sub>0,5</sub> -0Ca-600	APS <sub>0,5</sub> -1,25Ca-600
d <sub>4,3</sub> SDS (μm)	2,88±0,06 <sup>b</sup>	2,9±0,1 <sup>b</sup>	2,98±0,03 <sup>b</sup>	3,56±0,03 <sup>a</sup>
pH		pH 7,0		
Muestras	APS <sub>0,5</sub> -0Ca-0,1	APS <sub>0,5</sub> -2,5Ca-0,1	APS <sub>0,5</sub> -0Ca-600	APS <sub>0,5</sub> -2,5Ca-600
d <sub>4,3</sub> SDS (μm)	2,84±0,05 <sup>b</sup>	2,93±0,01 <sup>b</sup>	2,25±0,05 <sup>c</sup>	2,40±0,06 <sup>c</sup>

**Letras diferentes indican diferencias significativas (Test de Tukey, p<0,05).**

Cuando se analizaron las emulsiones en ausencia de SDS todas las muestras mostraron un alto nivel de floculación por puenteo, probablemente también debido a una cantidad insuficiente de emulsificante (Figura II.27., paneles a) y d)) (Mc Clements, 2005). La presencia de calcio en APS<sub>0,5</sub>-1,25Ca-pH5,9-0,1 y el tratamiento con APH en APS<sub>0,5</sub>-0Ca-pH5,9-600 disminuyeron el tamaño de los flóculos (ver índice de floculación en la Figura II.27., paneles a) y d)). La combinación calcio y APH (APS<sub>0,5</sub>-1,25Ca-pH5,9-600) condujo a flóculos similares a los de APS<sub>0,5</sub>-0Ca-pH5,9-0,1 (Figura II.27, paneles a) y d)).



**Figura II.26.** Distribución de tamaño de gota en emulsiones preparadas a partir de dispersiones de APS 5 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 5,9 en presencia de SDS a tiempo 0 (paneles a) y d)), 3 días (paneles b) y e)) y 8 días (paneles c) y f)) a partir del momento de su preparación.

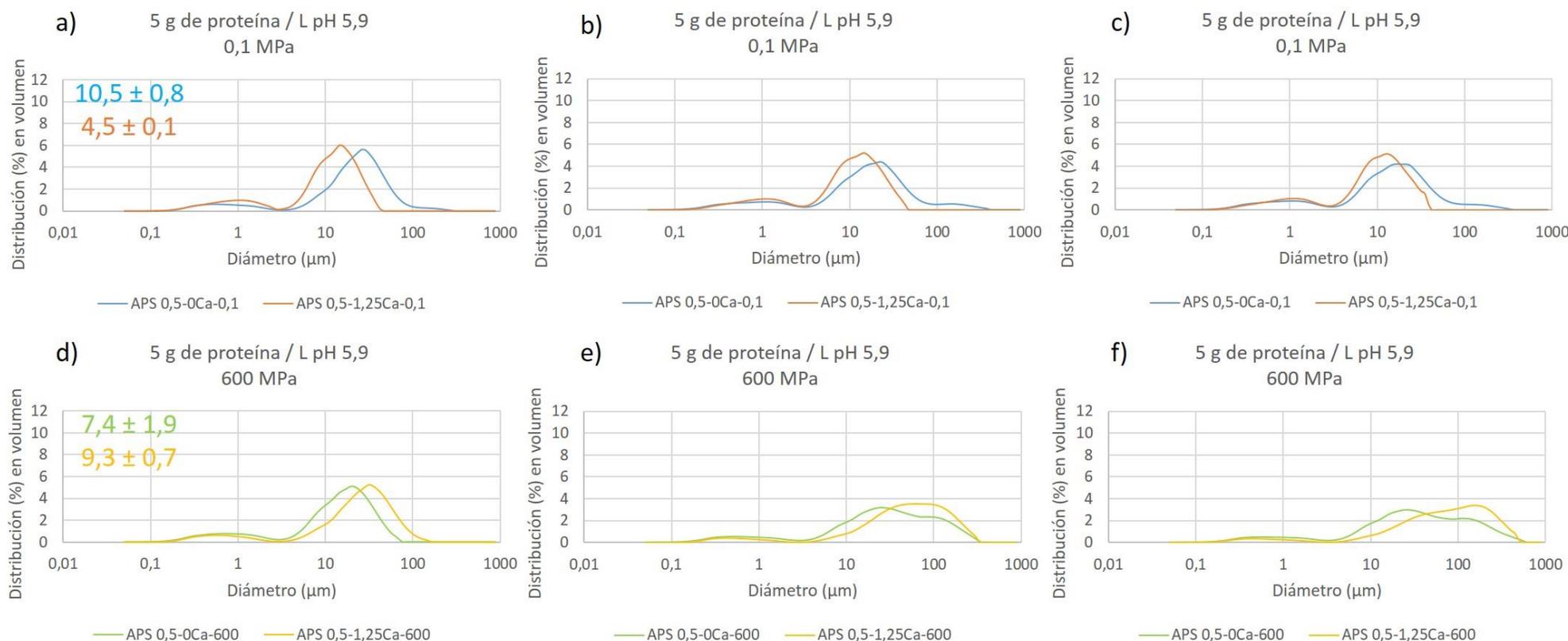


Figura II.27. Distribución de tamaño de flóculo en emulsiones preparadas a partir de dispersiones de APS 5 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 5,9 en ausencia de SDS a tiempo 0 (paneles a) y d)), 3 días (paneles b) y e)) y 8 días (paneles c) y f)) a partir del momento de su preparación. Los valores indicados en los paneles a) y d) corresponden al índice de floculación.

Al analizar a través de microscopía óptica la estructura de los flóculos no se encontraron diferencias entre las distintas condiciones, observándose flóculos de formas irregulares relativamente compactos (Figura II.28.).

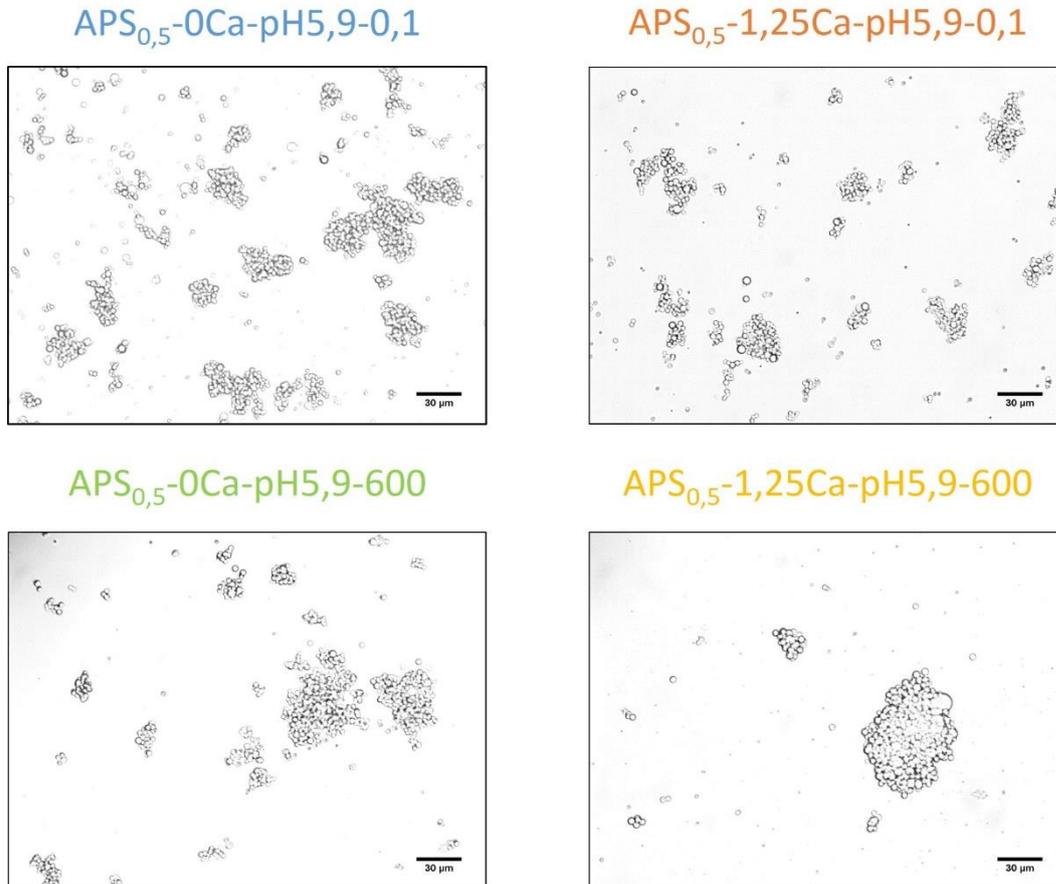


Figura II.28. Microfotografías de flóculos presentes en emulsiones obtenidas a partir de dispersiones de APS 5 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 5,9.

#### 2.3.2.1.2. Emulsiones obtenidas a partir de dispersiones de APS 5 g de proteína.L<sup>-1</sup>, pH 7,0

Las distribuciones de tamaño de gota en presencia de SDS en las emulsiones obtenidas a partir de las dispersiones APS<sub>0,5</sub>-0Ca-pH7,0-0,1 y APS<sub>0,5</sub>-2,5Ca-pH7,0-0,1 (Figura II.29., paneles a) y d)) fueron similares a las observadas para las obtenidas a partir de las dispersiones a pH 5,9. Por otra parte, las emulsiones obtenidas a partir de las dispersiones tratadas con APH (APS<sub>0,5</sub>-0Ca-pH7,0-600 y APS<sub>0,5</sub>-2,5Ca-pH7,0-600) presentaron menor coalescencia (aumento relativo en la población de gotas de menor tamaño) que las obtenidas con las dispersiones sin tratamiento, lo que sugiere que el tratamiento con APH

mejoró la habilidad de estas proteínas para formar un film interfacial más resistente en estas condiciones (Figura II.29., paneles a) y d) y Tabla II.4.). La presencia de calcio no modificó la distribución de tamaños de gota en las emulsiones preparadas con muestra tratadas o no tratadas con APH.

Todas las emulsiones analizadas en ausencia de SDS mostraron un alto nivel de floculación (Figura II.30, paneles a) y d)). La presencia de calcio en APS<sub>0,5-2,5Ca-pH7,0-0,1</sub> indujo una tendencia a la disminución del tamaño de los flóculos. Comportamiento similar, pero de mayor magnitud, se había observado en las emulsiones correspondientes a las obtenidas con dispersiones a pH 5,9. Luego del tratamiento con APH los flóculos tuvieron menores tamaños en APS<sub>0,5-0Ca-pH7,0-600</sub>, aunque el índice de floculación se mantuvo porque también disminuyó el tamaño individual de las gotas (Tabla II.4.). La combinación calcio-APH (APS<sub>0,5-2,5Ca-pH7,0-600</sub>) aumentó el índice de floculación. (Figura II.30, paneles a) y d)).

El análisis de la microestructura sugiere que los flóculos más compactos se encontraron en las emulsiones preparadas con APS<sub>0,5-0Ca-pH7,0-600</sub> (Figura II.31.).

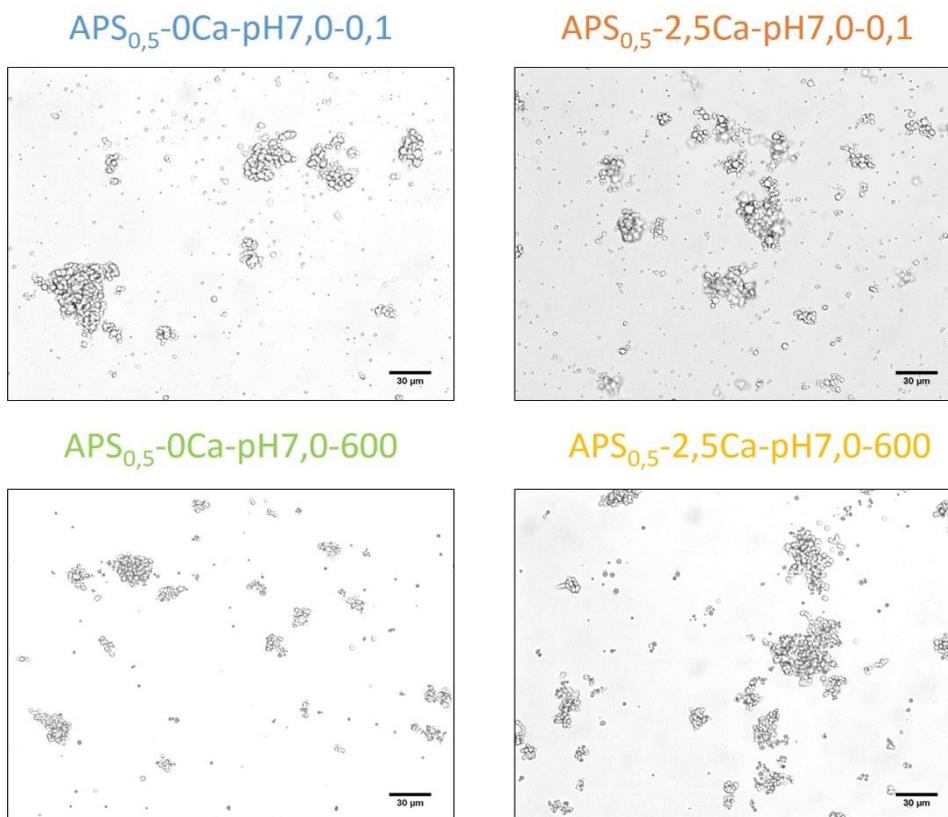
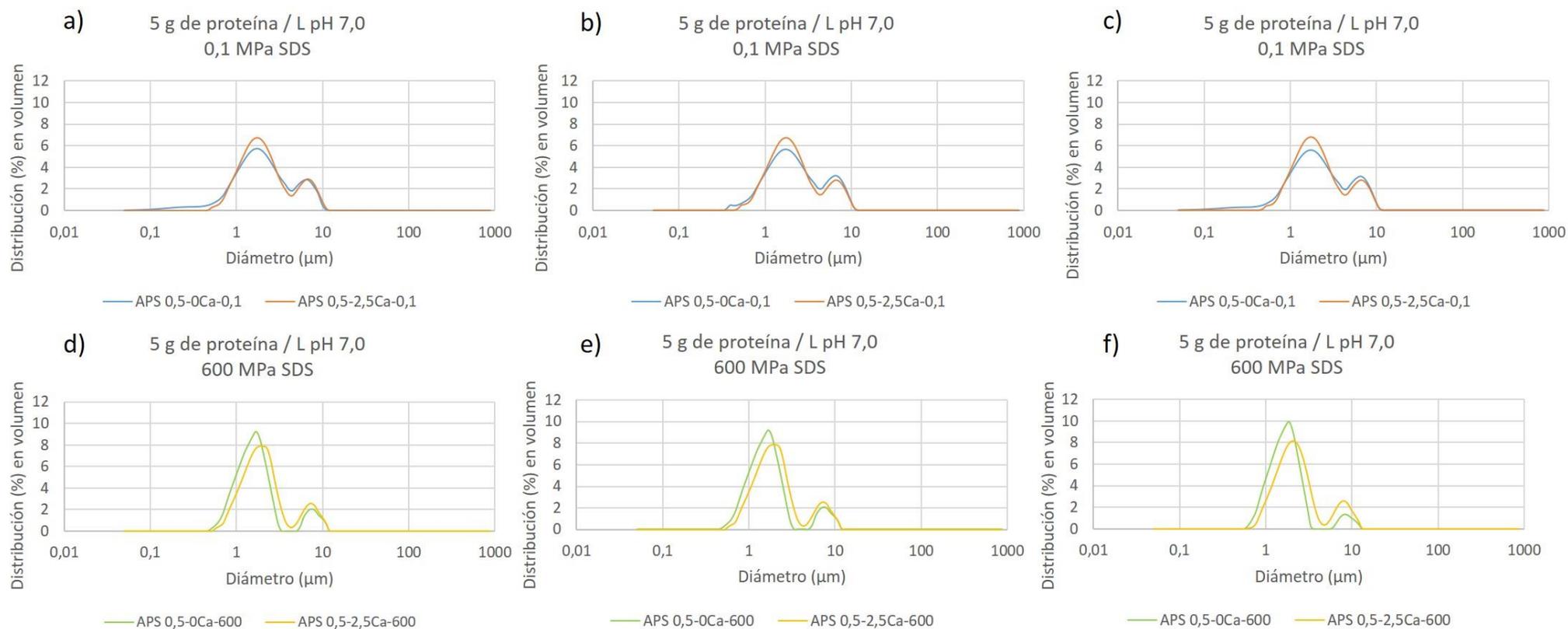
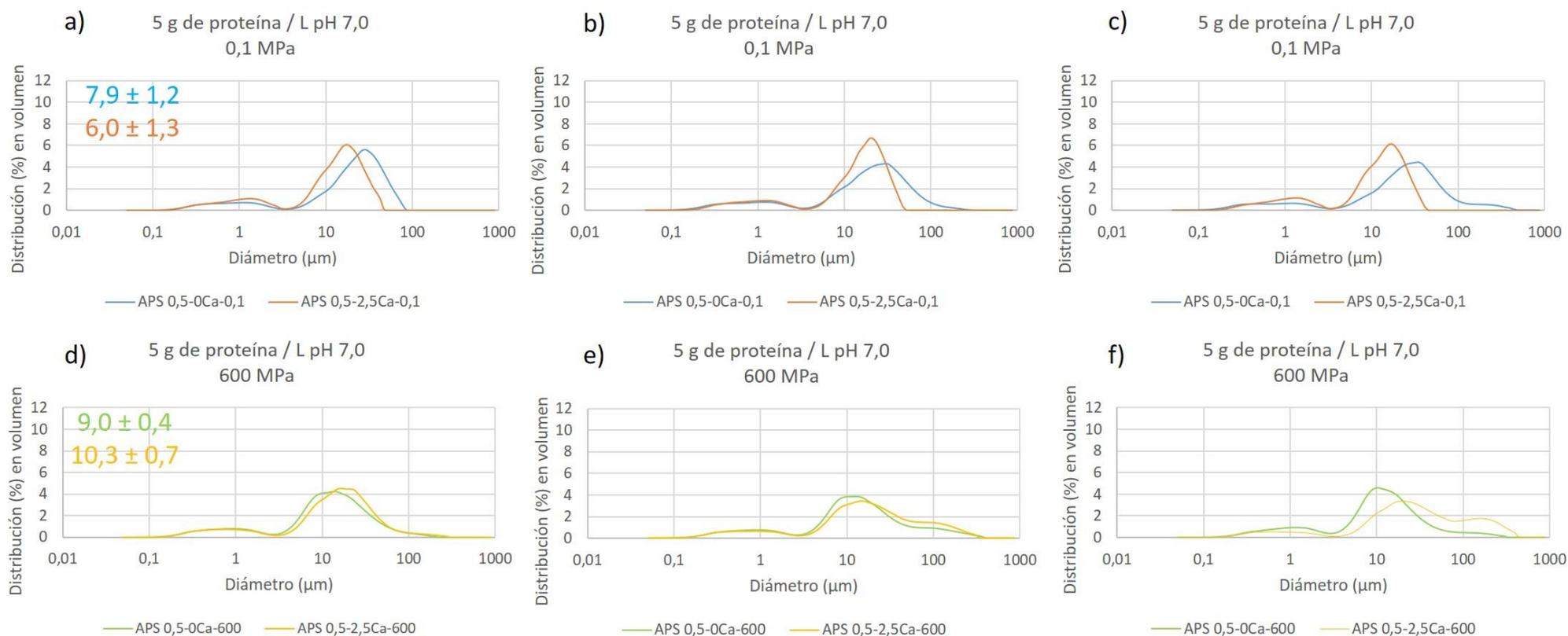


Figura II.31. Microfotografías de flóculos presentes en emulsiones obtenidas a partir de dispersiones de APS 5 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 7,0.



**Figura II.29.** Distribución de tamaño de gota en emulsiones preparadas a partir de dispersiones de APS 5 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 7,0 en presencia de SDS a tiempo 0 (paneles a) y d)), 3 días (paneles b) y e)) y 8 días (paneles c) y f)) a partir del momento de su preparación.



**Figura II.30.** Distribución de tamaño de flóculo en emulsiones preparadas a partir de dispersiones de APS 5 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 7,0 en ausencia de SDS a tiempo 0 (paneles a) y d)), 3 días (paneles b) y e)) y 8 días (paneles c) y f)) a partir del momento de su preparación. Los valores indicados en los paneles a) y d) corresponden al índice de floculación.

### 2.3.2.1.3. Emulsiones obtenidas a partir de dispersiones de APS 10 g de proteína.L<sup>-1</sup>, pH 5,9

En presencia de SDS todas las emulsiones obtenidas también mostraron dos poblaciones, una de menor diámetro y mayor proporción y la otra población, de menor proporción, formada por coalescencia (Figura II.32.). El fenómeno de coalescencia en todos los casos fue de menor magnitud que en las emulsiones formadas con 5 g de proteína.L<sup>-1</sup> (Tabla II.4. y Tabla II.5.). El hecho que la coalescencia haya sido menor con dispersiones 10 g de proteína.L<sup>-1</sup> en relación a 5 g de proteína.L<sup>-1</sup> reafirma lo propuesto anteriormente sobre la insuficiencia en la cantidad de emulsificante.

La combinación calcio-APH en APS<sub>1</sub>-2,5Ca-pH5,9-600 condujo al mayor grado de coalescencia (Figura II.32., paneles a) y d) y Tabla II.5.). Este resultado fue similar al observado en APS<sub>0,5</sub>-1,25Ca-pH5,9-600, donde la menor concentración proteica había agravado la coalescencia. En este caso, el aumento de concentración proteica permitió que la población de gotas de menor diámetro fuera más abundante que la población de gotas de mayor diámetro.

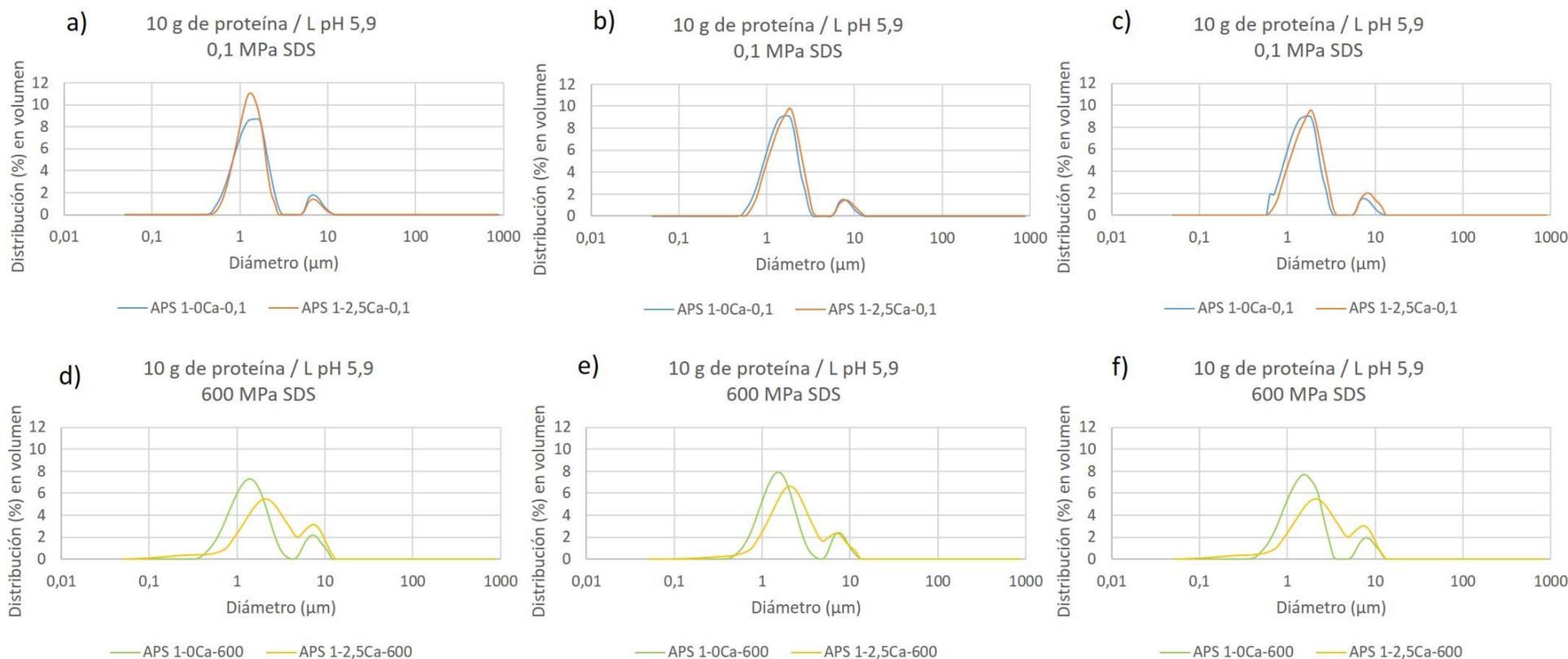
**Tabla II.5. Valores de diámetro de De Brouckere (d<sub>4,3</sub>) en presencia de SDS para las emulsiones obtenidas a partir de dispersiones 10 g de proteína.L<sup>-1</sup>**

pH		pH 5,9		
Muestras	APS <sub>1</sub> -0Ca-0,1	APS <sub>1</sub> -2,5Ca-0,1	APS <sub>1</sub> -0Ca-600	APS <sub>1</sub> -2,5Ca-600
d <sub>4,3</sub> SDS (µm)	1,9±0,1 <sup>b,c</sup>	1,83±0,04 <sup>b,c</sup>	2,28±0,00 <sup>b</sup>	3,10±0,05 <sup>a</sup>
pH		pH 7,0		
Muestras	APS <sub>1</sub> -0Ca-0,1	APS <sub>1</sub> -5Ca-0,1	APS <sub>1</sub> -0Ca-600	APS <sub>1</sub> -5Ca-600
d <sub>4,3</sub> SDS (µm)	1,7±0,1 <sup>c</sup>	1,75±0,06 <sup>c,d</sup>	1,5±0,3 <sup>c</sup>	2,25±0,00 <sup>b,d</sup>

Letras diferentes indican diferencias significativas (Test de Tukey, p<0,05).

Cuando se analizaron las emulsiones en ausencia de SDS todas las muestras nuevamente mostraron un alto nivel de floculación por puenteo (Figura II.33., paneles a) y d)). La presencia de calcio no afectó el tamaño de los flóculos en las emulsiones preparadas a partir de las dispersiones sin tratamiento con APH (Figura II.33., panel a)).

Las emulsiones obtenidas a partir de APS<sub>1</sub>-2,5Ca-pH5,9-600 mostraron el mayor índice floculación (Figura II.33., paneles a) y d)).



**Figura II.32.** Distribución de tamaño de gota en emulsiones preparadas a partir de dispersiones de APS 10 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 5,9 en presencia de SDS a tiempo 0 (paneles a) y d)), 3 días (paneles b) y e)) y 8 días (paneles c) y f)) a partir del momento de su preparación.

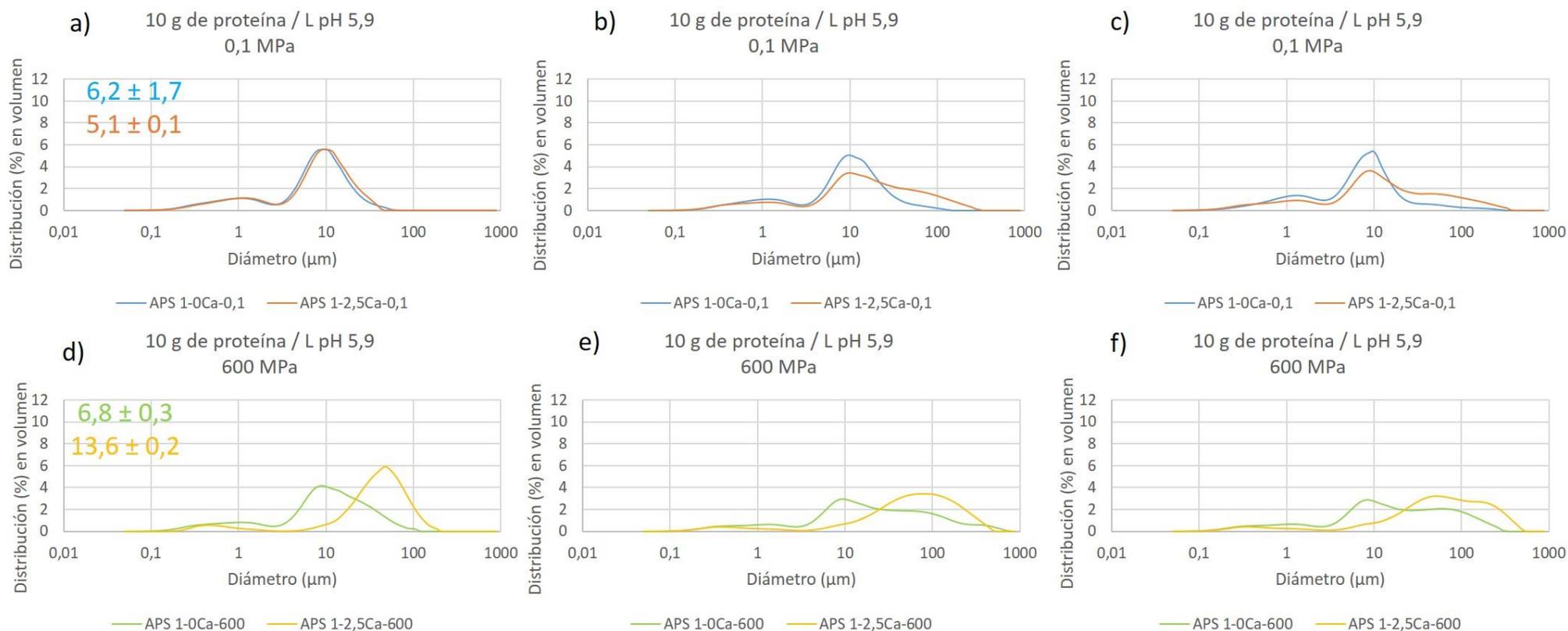


Figura II.33. Distribución de tamaño de flóculo en emulsiones preparadas a partir de dispersiones de APS 10 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 5,9 en ausencia de SDS a tiempo 0 (paneles a) y d)), 3 días (paneles b) y e)) y 8 días (paneles c) y f)) a partir del momento de su preparación. Los valores indicados en los paneles a) y d) corresponden al índice de floculación.

La microestructura de los flóculos fue afectada por la presencia del calcio y de la combinación calcio-tratamiento con APH, en APS<sub>1</sub>-2,5Ca-pH5,9-0,1 y APS<sub>1</sub>-2,5Ca-pH5,9-600 los flóculos tuvieron formas más irregulares y estructura menos empaquetadas (Figura II.34).

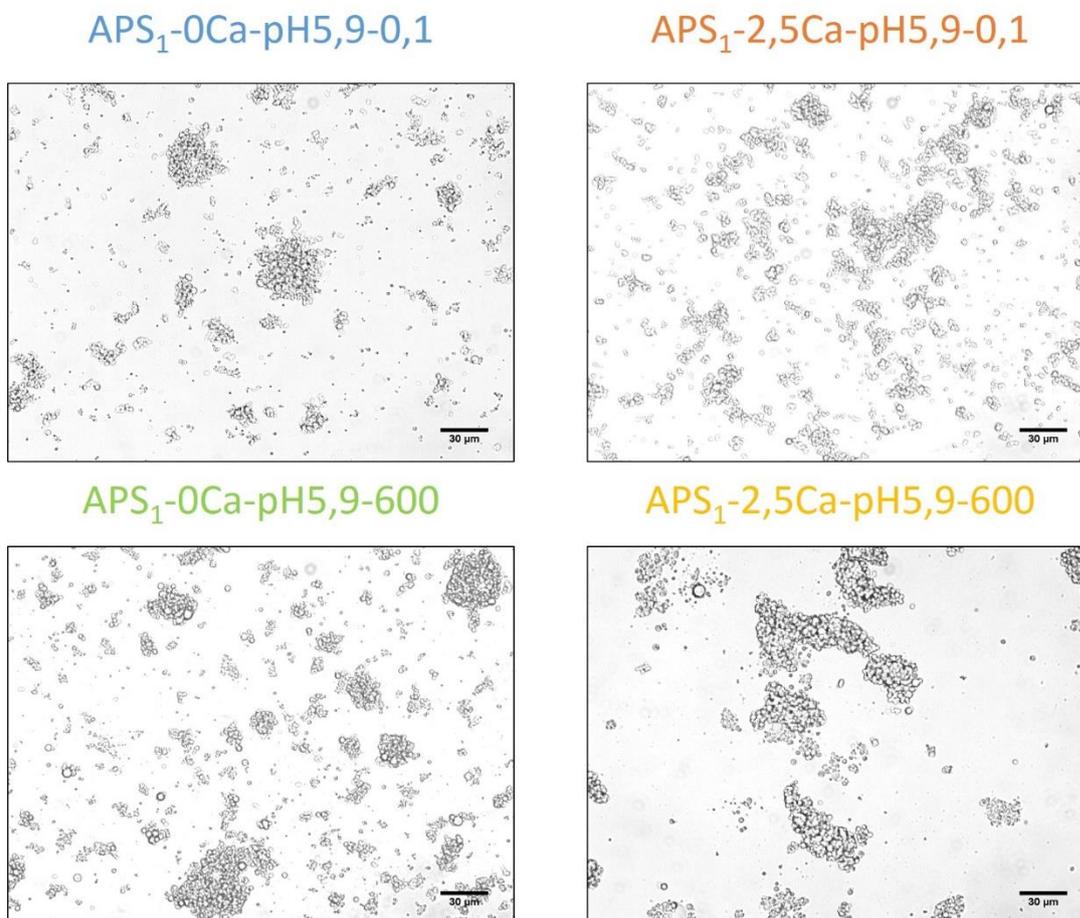


Figura II.34. Microfotografías de flóculos presentes en emulsiones obtenidas a partir de dispersiones de APS 10 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 5,9.

#### 2.3.2.1.4. Emulsiones obtenidas a partir de dispersiones de APS 10 g de proteína.L<sup>-1</sup>, pH 7,0

En presencia de SDS todas las emulsiones mostraron dos poblaciones, una de menor diámetro y mayor proporción y la otra población, que representan gotas de mayor tamaño formadas por coalescencia, de menor proporción (Figura II.35, paneles a) y d)).

Se observó el mayor grado de coalescencia nuevamente con la combinación calcio-APH (Figura II.35., paneles a) y d) y Tabla II.5.). El  $d_{4,3}$  de APS<sub>1</sub>-5Ca-pH7,0-600 fue

significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que  $APS_1-0Ca-pH7,0-600$  y mostro una tendencia ( $p = 0,054$ ) con  $APS_1-5Ca-pH7,0-0,1$ . Esto sugiere que los agregados generados por la combinación de los factores calcio y tratamiento APH tuvieron menor capacidad emulsificante que cuando los factores se aplicaron por separado.

Cuando se analizaron las emulsiones en ausencia de SDS todas las muestras nuevamente mostraron un alto grado de floculación (Figura II.36., paneles a) y d)). En las emulsiones preparadas a partir de  $APS_1-5Ca-pH7,0-0,1$  y  $APS_1-0Ca-pH7,0-600$  se encontraron los menores índices de floculación. Por otra parte, el índice fue máximo cuando el calcio se combinó con el tratamiento APH (Figura II.36., panel d)).

El análisis por microscopía óptica de las emulsiones mostró que los flóculos más compactos correspondieron a la muestra  $APS_1-0Ca-pH7,0-600$  (Figura II.37.).

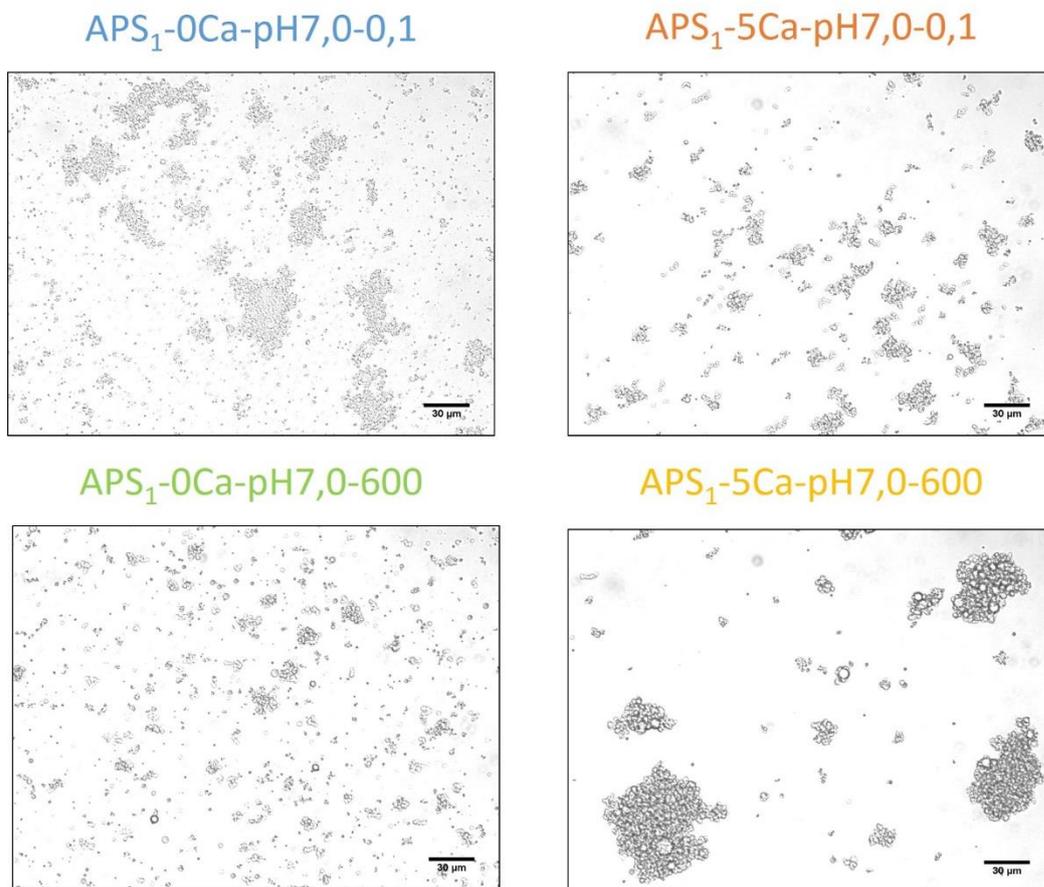
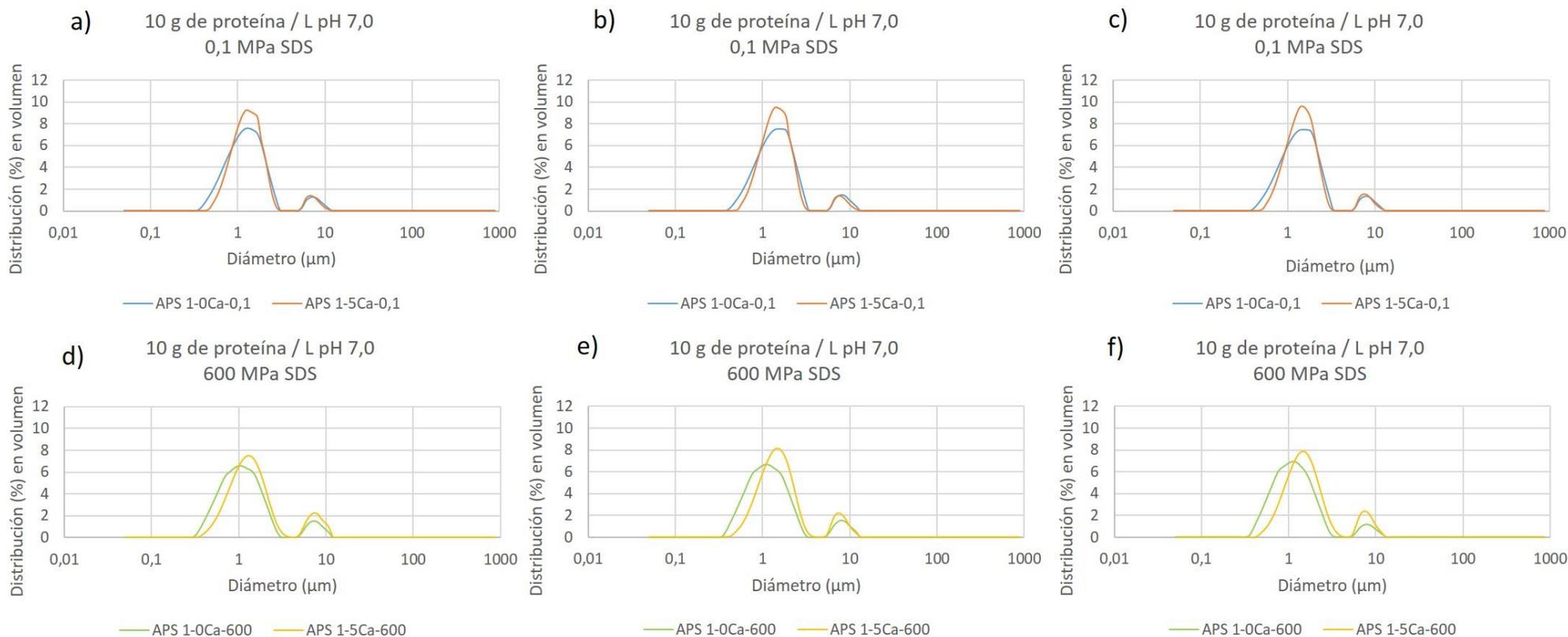


Figura II.37. Microfotografías de flóculos presentes en emulsiones obtenidas a partir de dispersiones de APS 10 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 7,0.



**Figura II.35.** Distribución de tamaño de gota en emulsiones preparadas a partir de dispersiones de APS 10 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 7,0 en presencia de SDS a tiempo 0 (paneles a) y d)), 3 días (paneles b) y e)) y 8 días (paneles c) y f)) a partir del momento de su preparación.

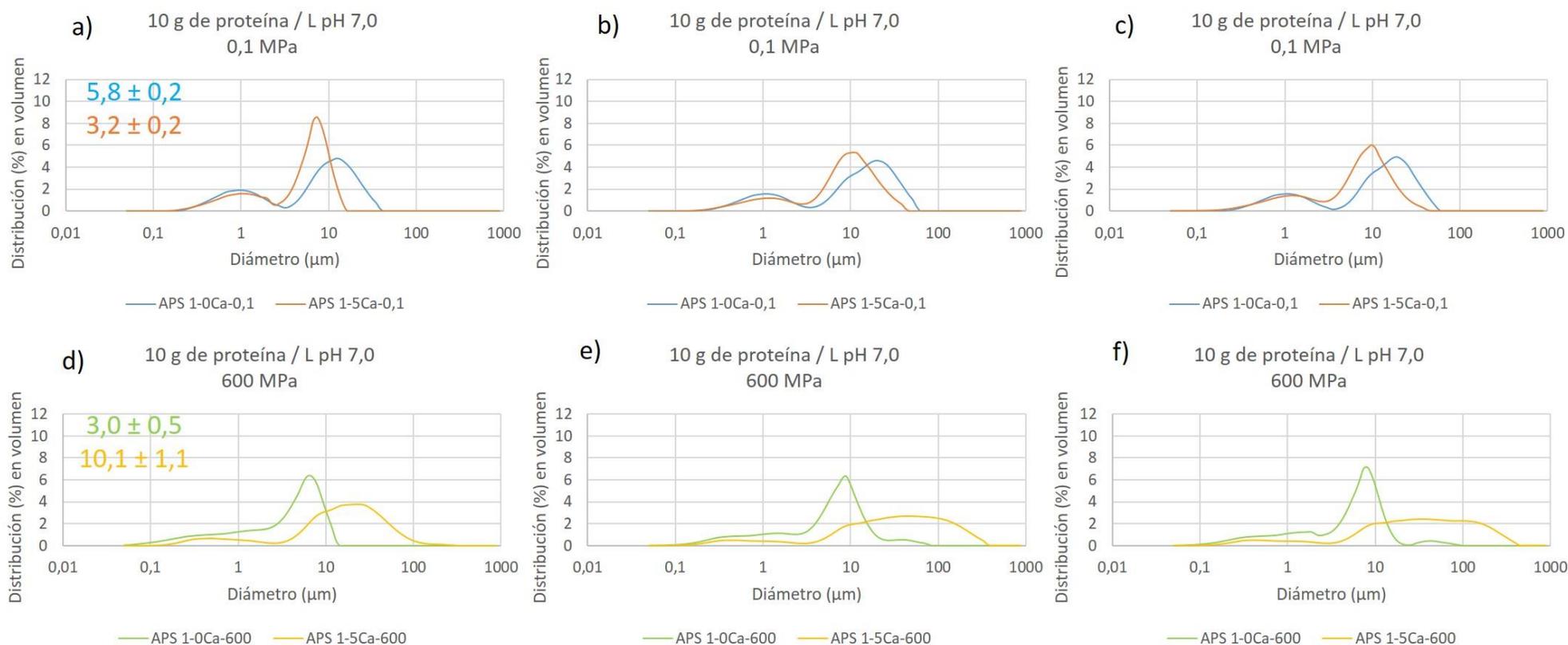


Figura II.36. Distribución de tamaño de floculo en emulsiones preparadas a partir de dispersiones de APS 10 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 7,0 en ausencia de SDS a tiempo 0 (paneles a) y d)), 3 días (paneles b) y e)) y 8 días (paneles c) y f)) a partir del momento de su preparación. Los valores indicados en los paneles a) y d) corresponden al índice de floculación.

Todas las emulsiones exhibieron coalescencia, los casos en que este fenómeno tuvo mayor magnitud fueron APS<sub>0,5</sub>-1,25Ca-pH5,9-600 y APS<sub>1</sub>-2,5Ca-pH5,9-600, lo que sugiere que a pH 5,9 la combinación calcio y tratamiento con APH reduce la capacidad de formación de emulsiones.

Todas las emulsiones presentaron floculación por puenteo, los menores índices de floculación se detectaron en APS<sub>1</sub>-0Ca-pH7,0-600 y APS<sub>1</sub>-5Ca-pH7,0-0,1. En cada condición de concentración proteica y pH, la combinación calcio y tratamiento con APH tuvo los más altos valores de índice de floculación. El mayor índice se detectó en APS<sub>1</sub>-2,5Ca-pH5,9-600. Estos resultados indican que la combinación calcio y tratamiento con APH promueve la floculación por puenteo, mientras que el calcio y el tratamiento con APH por separado la desfavorecen.

La coalescencia y la floculación por puenteo podrían deberse a una insuficiente concentración proteica, pero llama la atención que el aumento de concentración proteica de APS<sub>0,5</sub>-1,25Ca-pH5,9-600 a APS<sub>1</sub>-2,5Ca-pH5,9-600, aumentó la floculación. Esto sugiere que otros factores gobiernan la floculación, además de la concentración proteica. Ye y Singh (2001) propusieron que el calcio en emulsiones estabilizadas por caseínas favorecía el recubrimiento de la interfase porque la agregación proteica facilitaría la llegada de una mayor cantidad de proteína a la interfase, que luego se concentraría en ella. Este mecanismo podría ocurrir en las muestras con calcio sin tratamiento con APH, donde abundaban los “agregados grandes” (Figuras sección 2.3.1.4.). Por otro lado, en las muestras con calcio y tratamiento con APH, donde los agregados eran “pequeños” se podría dar otro mecanismo en que estas especies interactuaran entre sí tal vez a través de puentes de hidrógeno y/o interacciones hidrofóbicas (ya que el SDS fue capaz de desensamblar estos agregados). Estas interacciones se establecerían durante la homogenización cuyo trabajo mecánico funcionaría como un agente modificador de la estructura. En ese sentido, Speroni, Jung y de Lamballerie (2009) analizaron la gelificación térmica de proteínas de soja previamente tratadas con APH en presencia o ausencia de calcio adicionado y encontraron que el tratamiento previo con APH generaba geles más débiles que los controles, mientras que el tratamiento en presencia de calcio los hacía más fuertes. Estos cambios en la fuerza de los geles se interpretaron como producto de la disminución o aumento de interacciones entre polipéptidos. El tratamiento con APH generaría especies

con distinta capacidad para interactuar entre sí cuando fueran perturbadas por un segundo tratamiento, térmico u homogeneización. En presencia de calcio el tratamiento con APH promovería las interacciones (aumentando la fuerza de los geles o generando puentes entre gotas), mientras que en su ausencia las obstaculizaría (disminuyendo la fuerza de los geles o el puenteo entre gotas). Las observaciones de microscopía óptica también sugieren la ocurrencia de este fenómeno dado que los flóculos más compactos se observaron con dispersiones a pH 7,0 tratadas con APH sin calcio, mientras que los flóculos con empaquetamientos más abiertos se encontraron con la combinación calcio y tratamiento con APH. McClements (2005) postuló que los flóculos compactos se producen cuando las interacciones entre polipéptidos son débiles (la energía cinética compite con la de la unión y se producen reordenamientos), mientras que los empaquetamientos abiertos se producen por fuertes interacciones entre proteínas (la energía cinética es menor que la de la unión y no se producen reordenamientos una vez que los polipéptidos se contactan).

Por otra parte, teniendo en cuenta los resultados de la sección 2.3.1.5. (isotermas en la balanza de Langmuir) en donde los ensayos realizados con la fracción proteica soluble exhibieron diferencias relativamente pequeñas en cuanto a su actividad interfacial y que, en las emulsiones, preparadas con proteína soluble e insoluble exhibieron diferencias más importantes, planteamos que las diferencias entre las fracciones insolubles originaron probablemente los distintos comportamientos de coalescencia y floculación.

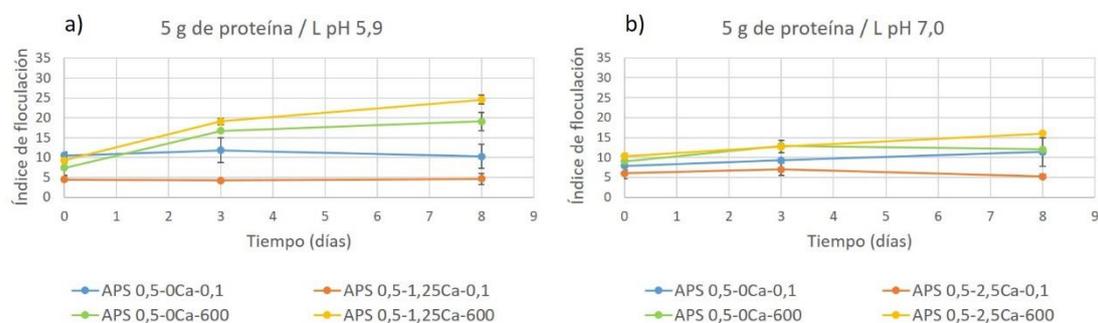
### 2.3.3. Estabilidad de las emulsiones

Se estudió la estabilidad de las emulsiones almacenadas a 4 °C durante 8 días. No se registraron cambios en cuanto a la coalescencia durante todo el tiempo que duró el ensayo en ninguna de las emulsiones obtenidas (figuras correspondientes a distribución de tamaño de gota en presencia de SDS). Esto podría estar relacionado con la presencia de un film interfacial estructurado, como sugieren los resultados de reología interfacial (sección 2.3.1.6.). Este film evitaría la coalescencia a pesar del gran nivel de floculación detectado en todas las emulsiones.

Los fenómenos de desestabilización estuvieron asociados a la floculación por puenteo.

### 2.3.3.1. Evolución del índice de floculación en emulsiones obtenidas a partir de dispersiones de APS 5 g de proteína.L<sup>-1</sup>

A ambos pHs los índices de floculación de las emulsiones obtenidas a partir de las dispersiones no tratadas con APH resultaron constantes a lo largo de 8 días. Sin embargo, en las emulsiones obtenidas a partir de las dispersiones tratadas con APH, tanto en ausencia como en presencia de calcio, se observó un aumento en los valores del índice de floculación (Figura II.38.), producto del aumento de las poblaciones de flóculos de tamaños mayores a 100  $\mu\text{m}$  que se solaparon generando distribuciones ensanchadas (Figuras II.27. y II.30., paneles e) y f)). El aumento más notorio del índice de floculación se encontró en las emulsiones correspondientes a pH 5,9 (Figura II.38., panel a)).



**Figura II.38.** Índices de floculación de emulsiones obtenidas a partir de dispersiones 5 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 5,9 (panel a)) y 7,0 (panel b)) durante 8 días de almacenamiento a 4 °C.

### 2.3.3.2. Evolución del índice de floculación en emulsiones obtenidas a partir de dispersiones de APS 10 g de proteína.L<sup>-1</sup>

A pH 5,9 los valores del índice de floculación de las emulsiones obtenidas a partir de las dispersiones APS<sub>1</sub>-0Ca-pH5,9-0,1 permanecieron constantes a lo largo de 8 días (Figura II.39.). Sin embargo, en las otras emulsiones el índice aumentó, siendo el efecto de mayor magnitud en APS<sub>1</sub>-2,5Ca-pH5,9-600, donde se observaron flóculos de más de 200  $\mu\text{m}$  (Figura II.33., paneles e) y f)).

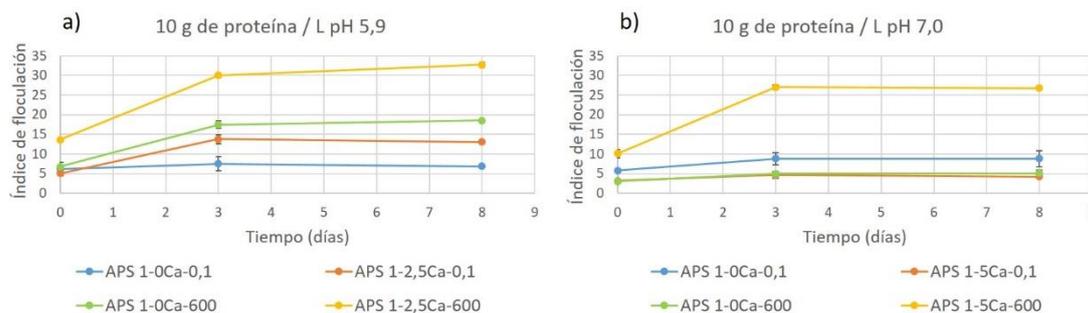


Figura II.39. Índices de floculación de emulsiones obtenidas a partir de dispersiones 10 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 5,9 (panel a) y 7,0 (panel b)) durante 8 días de almacenamiento a 4 °C.

A pH 7,0 las emulsiones obtenidas a partir de las dispersiones APS<sub>1</sub>-0Ca-pH7,0-0,1, APS<sub>1</sub>-5Ca-pH7,0-0,1 y APS<sub>1</sub>-0Ca-pH7,0-600 no tuvieron cambios significativos en sus índices de floculación. La combinación calcio y tratamiento con APH condujo a un importante aumento del índice de floculación apareado con una distribución de tamaños de flóculos muy ensanchada (Figura II.36., paneles e) y f) y Figura II.39., panel b)).

En la mayoría de las emulsiones se detectó un aumento del índice de floculación en el almacenamiento a 4°C durante 8 días, para cualquier pH y concentración proteica, la incorporación de calcio en combinación con tratamiento con APH promovió el aumento del tamaño de los flóculos. Si bien la floculación por puenteo se favorece a baja concentración de proteína, en el presente trabajo, la floculación se incrementó en APS<sub>1</sub>-2,5Ca-pH5,9-600 y APS<sub>1</sub>-5Ca-pH7,0-600. Esto sugiere que los puentes entre gotas estarían dados por polipéptidos y sería concordante con lo postulado sobre la alta capacidad para establecer interacciones entre sí de estas proteínas modificadas por APH. En el caso de pH 5,9, el bajo valor absoluto del potencial- $\zeta$  (Figura II.17., panel a)) también pudo contribuir a promover la asociación entre agregados y consecuentemente entre gotas.

El aumento de la concentración proteica resultó en una mejora en la estabilidad en las muestras tratadas con APH sin calcio (APS<sub>0,5</sub>-0Ca-pH5,9-600 vs. APS<sub>1</sub>-0Ca-pH5,9-600 y APS<sub>0,5</sub>-0Ca-pH7,0-600 vs. APS<sub>1</sub>-0Ca-pH7,0-600). En estos casos el efecto se debería a que la mayor cantidad de proteína disponible evitaría el puenteo dado por polipéptidos compartidos entre dos gotas.

Las emulsiones con el menor valor, y constante, de índice de floculación fueron las preparadas con APS<sub>1</sub>-5Ca-pH7,0-0,1 vs. APS<sub>1</sub>-0Ca-pH7,0-600. Llama la atención que los agregados de las respectivas dispersiones fueron muy distintos

en cuanto a potencial- $\zeta$ , tamaño, estado de desnaturalización y solubilidad, pero generaron distribuciones de tamaño de flóculo muy parecidas (Figura II.36., paneles b), c), e) y f)). Este fenómeno pone de manifiesto las interacciones entre los distintos factores.

### 2.3.4. Cuantificación y caracterización molecular de proteína adsorbida en la interfase

#### 2.3.4.1. Determinación del porcentaje de proteína adsorbida

Los porcentajes de proteína adsorbida fueron relativamente altos en todos los casos, ya que los valores se encontraron en el rango 65,6 – 91,0 % (Figura II.40.).

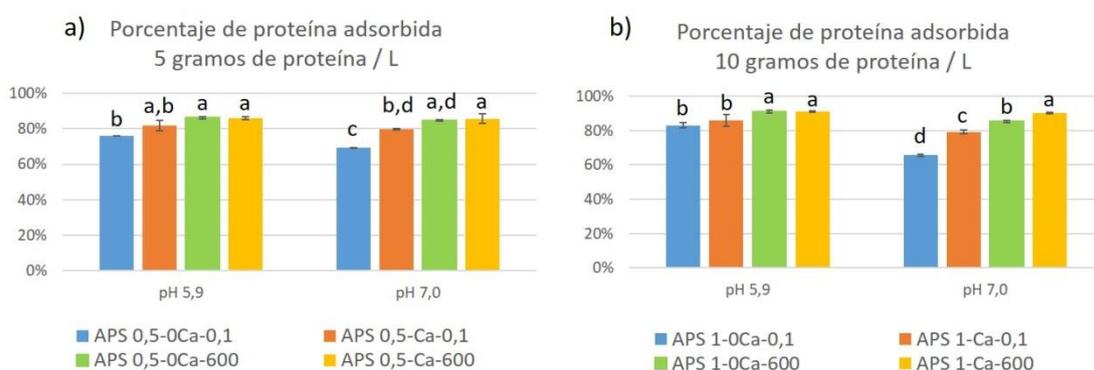


Figura II.40. Porcentaje de proteína adsorbida en la interfase de emulsiones o/w obtenidas a partir de dispersiones de APS 5 g de proteína.L<sup>-1</sup> (panel a)) o 10 g de proteína.L<sup>-1</sup> (panel b)). En la leyenda la concentración de calcio correspondiente a cada dispersión, según pH y concentración proteica, como se detalló en Tabla II.3. Letras diferentes dentro de cada panel indican diferencias significativas (test de Tukey, p<0,05).

Llama la atención que dispersiones en que la solubilidad fue baja (APS<sub>1-2,5Ca-pH5,9-0,1</sub> y APS<sub>1-2,5Ca-pH5,9-600</sub>) y presentaban “agregados grandes” alcanzaron porcentajes de proteína adsorbida similares a dispersiones en que la solubilidad fue muy alta y con “agregados pequeños” (APS<sub>1-0Ca-pH7,0-600</sub>). Al comparar el tamaño de los “agregados grandes” (más de 2,5  $\mu\text{m}$ ) con el de las gotas formadas (*ca.* 1,5  $\mu\text{m}$ ), y teniendo en cuenta el trabajo mecánico ejercido durante la homogeneización, es dable que los “agregados grandes” llegaran a la interfase gracias a las condiciones de flujo turbulentas (Walstra, 1983), una vez en la interfase se desensamblarían y formarían un film. En este proceso, el gran tamaño inicial del agregado favorecería el recubrimiento de la gota con una gran cantidad de proteína (Ye y Singh, 2001). No puede descartarse que los agregados grandes se disgregasen previamente a la llegada a la interfase durante la homogeneización, como lo describieron Bouaouina *et al.* (2006) para proteínas de suero de leche y a mayores

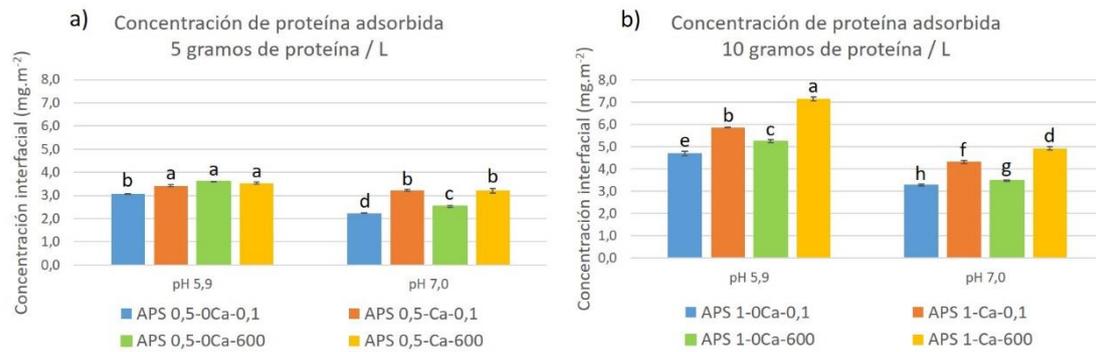
presiones que las alcanzadas en el homogeneizador del presente trabajo. Por otra parte, en los casos en que las dispersiones contuvieron “agregados pequeños” desnaturalizados por el tratamiento con APH sin calcio, la adsorción podría estar favorecida por el aumento de flexibilidad e hidrofobicidad superficial (Puppo *et al.* 2005).

Los mayores porcentajes de proteína adsorbida se encontraron en las emulsiones preparadas a partir de dispersiones tratadas con APH (con y sin calcio) a pH 5,9, a ambas concentraciones proteicas (Figura II.40., paneles a) y b)).

En el caso de las emulsiones obtenidas con dispersiones a pH 7,0 la presencia de calcio y el tratamiento con APH produjeron incrementos en el porcentaje de proteína adsorbida, cuando estos factores se combinaron en las muestras de 10 g.L<sup>-1</sup> el incremento fue aún mayor (Figura II.40., paneles a) y b)). En estas muestras tanto el calcio como el tratamiento con APH favorecieron la adsorción. El efecto del calcio podría ser el propuesto por Ye y Singh (2001) consistente en el acercamiento a la interfase de mayor cantidad de proteína y promoción de un mayor empaquetamiento por reducir la repulsión entre cargas. El efecto del tratamiento con APH podría estar basado en una mayor flexibilidad debida a la desnaturalización.

#### 2.3.4.2. Determinación de la concentración de proteína interfacial

La concentración de proteína interfacial (CPI) tuvo una fuerte dependencia con la concentración proteica de las dispersiones, a 5 g.L<sup>-1</sup> se encontró para cada condición de pH, calcio y tratamiento con APH, menores valores que a 10 g.L<sup>-1</sup> (Figura II.41.). Este resultado es coherente con lo planteado en las secciones II.2.3.2.1.1. y II.2.3.2.1.3. sobre una insuficiente cantidad de proteína. El aumento de 5 a 10 g.L<sup>-1</sup> permitiría la formación de un film más compacto.



**Figura II.41. Concentración de proteína adsorbida ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$ ) en la interfase de emulsiones o/w obtenidas a partir de dispersiones de APS 5 g de proteína. $\text{L}^{-1}$  (panel a) o 10 g de proteína. $\text{L}^{-1}$  (panel b)). En la leyenda la concentración de calcio correspondiente a cada dispersión, según pH y concentración proteica, como se detalló en Tabla II.3. Letras diferentes dentro de cada panel indican diferencias significativas (test de Tukey,  $p < 0,05$ ).**

En las emulsiones preparadas con dispersiones a pH 5,9 el calcio, el tratamiento con APH o su combinación aumentaron la CPI (Figura II.41., paneles a) y b)). Este efecto fue más notorio y mostró diferencias entre condiciones a  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , donde se encontraron valores como 5,9 y  $7,2 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$  en  $\text{APS}_{1-2,5\text{Ca-pH}5,9-0,1}$  y  $\text{APS}_{1-2,5\text{Ca-pH}5,9-600}$  respectivamente. Valores de CPI mayores a  $5 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$  se asocian a formación de multicapas o proyecciones filamentosas (Marc Anton, comunicación personal, 2015). El caso de  $\text{APS}_{1-2,5\text{Ca-pH}5,9-600}$ , que exhibió la mayor CPI y también el mayor índice de floculación de todas las emulsiones (Figura II.33., panel d)), sugiere que el film sería cohesivo o presentaría proyecciones cohesivas que explicarían la floculación por puenteo (secciones 2.3.2.1. y 2.3.3.2.).

En las emulsiones obtenidas con dispersiones a pH 7,0 también se detectó un aumento de la CPI en las muestras con calcio y tratadas con APH. En el caso de los tratamientos por separado, el efecto de la incorporación de calcio sobre la CPI fue mayor que el efecto del tratamiento con APH. A su vez, a  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  la combinación de incorporación de calcio y tratamiento con APH mostró la mayor CPI en el grupo de muestras correspondientes a pH 7,0 (Figura II.41., panel b)). Las emulsiones preparadas con  $\text{APS}_{0,5-2,5\text{Ca-pH}7,0-600}$  y  $\text{APS}_{1-5\text{Ca-pH}7,0-600}$ , mostraron altos índices de floculación (sección 2.3.2.1.). Esto sugiere un fenómeno similar al observado a pH 5,9, en que los agregados son capaces de acumularse en la interfase gracias a cambios estructurales que favorecen las interacciones entre sí.

### 2.3.4.3. Caracterización molecular de proteína adsorbida en la interfase

#### 2.3.4.3.1. Emulsiones obtenidas a partir de dispersiones de APS 5 g de proteína.L<sup>-1</sup>

Tanto a pH 5,9 como a pH 7,0, en las muestras no tratadas con APH, con o sin calcio, se observó que casi todas las especies presentes en la dispersión aparecían en la fracción adsorbida (FC), incluso agregados grandes que no ingresaron al gel de desarrollo (Figura II.42., paneles a) y c)). La banda correspondiente al polipéptido B libre ( $\approx 20$  kDa) de glicinina tuvo menor intensidad relativa en las calles correspondientes a la FC (Flechas rojas en Figura II.42., paneles a) y c)).

En las calles correspondientes a la fracción no adsorbida (FN) se detectaron bandas correspondientes a los polipéptidos  $\alpha'$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  de  $\beta$ -conglucina, y a los polipéptidos libres A y B de glicinina, sin observarse la banda de AB (Flechas verdes en Figura II.42., paneles a) y c)). Estos resultados indican que los agregados de mayores pesos moleculares, estabilizados por puentes disulfuro tuvieron una adsorción preferencial, mientras que los agregados que pudieron desensamblarse con el SDS del *buffer* de muestra de electroforesis o las proteínas que ya se encontraban disociadas en la dispersión permanecieron en la fase continua.

El tratamiento con APH modificó principalmente el perfil electroforético de FN disminuyendo la intensidad de casi todas las bandas, con excepción de la correspondiente al polipéptido B libre (de glicinina), el efecto fue mayor en las muestras de pH 5,9 (Flechas amarillas en Figura II.42., paneles b) y d)).

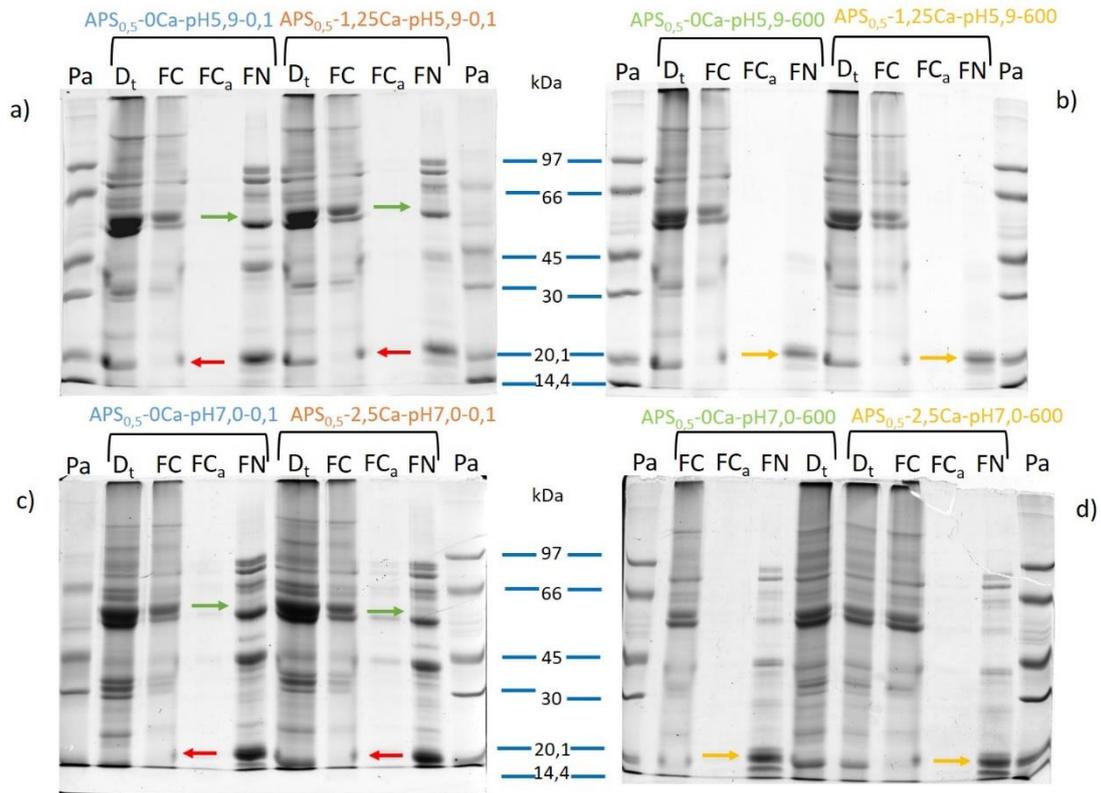


Figura II.42. SDS-PAGE de emulsiones obtenidas a partir de dispersiones de APS 5 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 5,9 (paneles a) y b)) y a pH 7,0 (paneles c) y d)). Pa: proteínas de masa molecular (kDa) conocida, Dt: dispersión total, FC: proteína adsorbida, FCa: proteína adsorbida en gotas que no llegan a cremar, FN: proteína no adsorbida.

2.3.4.3.2. Emulsiones obtenidas a partir de dispersiones de APS 10 g de proteína.L<sup>-1</sup>

Los perfiles fueron similares a los obtenidos a 5 g.L<sup>-1</sup>, con excepción a la fracción no adsorbida (FN), donde el aumento de concentración proteica en las dispersiones promovió la presencia de agregados de pesos moleculares entre *ca.* 100 y 150 kDa y la presencia de la subunidad AB de glicinina (Flechas azules, Figura II.43., paneles a) y b)). Al comparar con lo observado en las emulsiones preparadas con 5 g.L<sup>-1</sup>, se puede hipotetizar que la interfase presentó una afinidad preferencial por la subunidad AB y los agregados más grandes, reteniendo casi la totalidad de estas especies en condiciones de baja concentración de proteína. Cuando la concentración proteica aumentó a 10 g.L<sup>-1</sup>, alcanzó para que una parte de estas especies quedara en la fase continua de la emulsión.

El tratamiento con APH, al igual que en las emulsiones preparadas con 5g.L<sup>-1</sup>, disminuyó la intensidad de todas las bandas de la fracción no adsorbida con excepción de B libre. A

su vez el efecto fue más importante en las muestras a pH 5,9 (Figura II.43., paneles c) y d)).

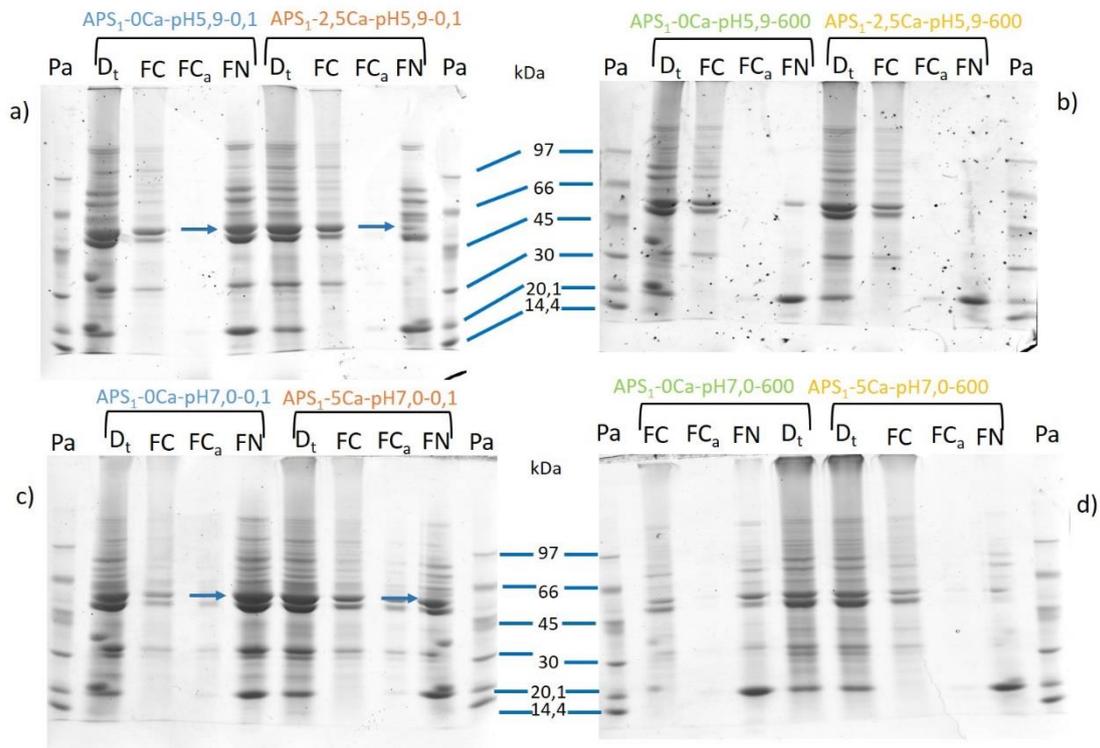


Figura II.43. SDS-PAGE de emulsiones obtenidas a partir de dispersiones de APS 10 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 5,9 (paneles a) y b)) y a pH 7,0 (paneles c) y d)). Pa: proteínas de masa molecular (kDa) conocida, Dt: dispersión total, FC: proteína adsorbida, FCa: proteína adsorbida en gotas que no llegan a cremar, FN: proteína no adsorbida.

Keerati-u-rai y Corredig (2009) analizaron la distribución de polipéptidos en emulsiones preparadas con APS y en el caso del control sin tratamientos desnaturizantes sugirieron que no hubo una adsorción preferencial de algún polipéptido, sino que todos se encontraron con igual abundancia relativa entre las fases continua y oleosa. Las diferencias con nuestros resultados sobre el polipéptido B libre pudo deberse a que estos autores realizaron las electroforesis en presencia de un agente reductor, aumentando las concentraciones de A y B en ambas fases y enmascarando las diferencias debidas a los polipéptidos que se encontraban libres al momento de preparar la emulsión. Por otra parte, la concentración del polipéptido B de glicinina en la fase continua observada en todas las muestras está de acuerdo con los resultados de Yuan *et al.* (2009) quienes informaron el menor índice de capacidad emulsificante de B libre (a pHs 5,0 y 7,0) cuando lo compararon con los índices de A libre y glicinina. Estos autores encontraron también que el polipéptido B exhibía la mayor hidrofobicidad superficial y la menor

solubilidad y atribuyeron las diferencias a los distintos balances de hidrofobicidad/hidrofilicidad y a otras cuestiones estructurales.

A ambos pHs las emulsiones preparadas con la incorporación de calcio en combinación con tratamiento con APH tuvieron los mayores valores de CPI y de índice de floculación (secciones 2.3.4.2. y 2.3.3., respectivamente) entre las muestras con igual pH y concentración proteica. Más aun, este efecto fue mayor a  $10\text{g.L}^{-1}$ . Este resultado supondría que la mayor CPI produjo emulsiones con mayor tendencia a la floculación, contrariamente a lo esperado, lo que sugiere la presencia de especies proteicas con mayor afinidad entre sí en relación a la afinidad por la interfase.

La distribución de agregados y polipéptidos mostró que la interfase tuvo afinidad por agregados grandes y estabilizados por puentes disulfuro, mientras que agregados más pequeños o que pudieron ser desensamblados por el SDS se encontraron tanto en la interfase como en el seno de la fase continua.

## 2.4. Conclusiones del Capítulo II

La incorporación de calcio en combinación con tratamiento con APH modificó los agregados insolubles haciéndolos solubles o mejorando su estabilidad coloidal. Estos efectos estuvieron mediados al menos en parte por una disminución del tamaño de los agregados. En las muestras a pH 5,9 en que la insolubilización se debió tanto a la incorporación de calcio como a la proximidad con el punto isoeléctrico, el efecto más evidente fue el aumento de estabilidad, mientras que en las muestras a pH 7,0 el efecto más evidente fue la solubilización. El cambio de pH condicionaría también los mecanismos involucrados, como sugieren los ensayos en que se ensayó incorporar el calcio antes o después del tratamiento con APH.

La concurrencia de varios mecanismos (reducción de agregados, aumento de interacción con el agua y/o con especies cargadas como  $H^+$  o *buffers*, cambios en el potencial- $\zeta$ ), sumado a la complejidad de las muestras (el APS es una mezcla de proteínas) dificultó encontrar una explicación única para todos los efectos observados.

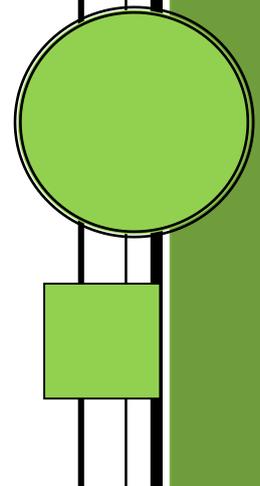
Todas las emulsiones exhibieron coalescencia y floculación por puenteo. Las condiciones que disminuyeron ambos fenómenos de desestabilización fueron las obtenidas a partir de dispersiones de APS 10 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 7,0 sin agregado de calcio tratadas con APH o adicionadas con 5 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> sin tratamiento con APH. Por su parte, las condiciones que incrementaron estos fenómenos fueron las obtenidas a partir de dispersiones de APS 5 o 10 g de proteína.L<sup>-1</sup> a pH 5,9 adicionadas con CaCl<sub>2</sub> y tratadas con APH. Esto sugiere que la incorporación de calcio en combinación con tratamiento con APH afectaría la capacidad de formación de emulsiones.

Notablemente en todas las condiciones se encontraron altos porcentajes de proteína adsorbida en la interfase, aunque posiblemente la estructura del film interfacial fue diferente en distintos casos. Las diferencias en los comportamientos se deberían principalmente a las características de los agregados “medianos” y “grandes” presentes en las dispersiones. El tratamiento con APH en dispersiones con calcio promovería la asociación proteína-proteína (a través de puentes de hidrogeno y/o interacciones hidrofóbicas) durante la homogeneización, generando un film con alta concentración de proteína interfacial a la vez que

punteo entre gotas. El punteo estaría dado por agregados que enlazarían los films de distintas gotas.

## Capítulo III

Tratamiento combinado de alta presión hidrostática y temperatura sobre leche de soja adicionada con calcio: optimización de los factores de proceso en relación a su efecto sobre algunas propiedades fisicoquímicas, bioquímicas y estabilidad física



### 3.1. Materiales y métodos

#### 3.1.1. Diseño experimental: optimización mediante la metodología de superficie de respuesta, aplicando red de Doehlert

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas útiles en el modelado y el análisis de problemas en los que una respuesta de interés recibe la influencia de diversas variables y donde el objetivo es optimizar esa respuesta. En el presente trabajo se estudió el efecto simultáneo de la concentración de  $\text{CaCl}_2$  (5, 10 o 15  $\text{mmol.L}^{-1}$ ), el nivel de presión aplicada (500, 550, 600, 650 o 700 MPa) y la temperatura inicial de las muestras y del fluido de compresión (45, 50, 55, 60 o 65 °C) sobre las variables respuesta solubilidad proteica (SP) porcentaje de inactivación de la enzima lipoxigenasa (%ILOX) y porcentaje de inactivación de factores antitripticos (%IFA). La elección de los niveles utilizados para cada factor está asociada, en parte, a los resultados obtenidos en los capítulos I y II del presente trabajo donde se encontró un interesante efecto de las APH sobre la solubilidad proteica de dispersiones acuosas de APS 10 g de proteína. $\text{L}^{-1}$  adicionadas con 5  $\text{mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  a pH 7,0 (valor de pH al que se ajustaron las leches de soja, ver sección 3.1.2). Dado que la concentración de proteína en las leches de soja fue tres veces superior a la de las dispersiones acuosas o *buffer*, se decidió trabajar con una concentración de calcio máxima también tres veces superior (15  $\text{mmol.L}^{-1}$ ). Por otra parte, dada la alta resistencia que presentan los inhibidores de tripsina a los tratamientos térmicos o con APH se eligieron rangos de temperatura inicial y niveles de presión tales que sus combinaciones permitiesen alcanzar un grado de inactivación aceptable de dichos factores antinutricionales.

Para evaluar el efecto simultáneo de los factores estudiados se planteó un diseño de Red de Doehlert (Doehlert, 1970). Este diseño presenta una distribución uniforme de los puntos sobre toda la región experimental, pudiendo estudiar los factores de diseño en diferentes niveles. El número de experimentos requeridos para los diseños de Doehlert se calcula mediante  $N=k^2+k+C_0$ , donde  $k$  representa el número de factores (tres en nuestro caso) y  $C_0$  el número de réplicas en el centro del diseño. Cabe destacar que en este tipo de diseño el número de niveles no es el mismo para todos los factores. Como regla general se eligen las variables con el efecto más importante y se las estudia en cinco niveles de manera de obtener un mayor nivel de información de los ensayos. En el presente trabajo los factores temperatura inicial y nivel de presión fueron los seleccionados para trabajar con cinco niveles y el factor concentración de

CaCl<sub>2</sub> con tres niveles. El diseño requirió la realización de 15 ensayos: 12 puntos distribuidos sobre toda el espacio experimental, con el centro del diseño (combinación de valores codificados 0,0,0) repetido por triplicado, de manera de poder determinar el error experimental (Araujo & Brereton, 1996). En la Tabla III.1. se muestran los valores reales y codificados de los factores y sus niveles. Los niveles de los factores fueron codificados de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$C_i = [(X_i - X_i^0) / \Delta X_i] \alpha$$

donde C<sub>i</sub> es el valor codificado para los niveles del factor i, X<sub>i</sub> es el valor real de cada factor en un experimento, X<sub>i</sub><sup>0</sup> es el valor real correspondiente al centro del dominio experimental (centro del diseño), ΔX<sub>i</sub> es el paso de la variación del valor real entre el centro y los límites (inferior y/o superior) y α es el valor límite codificado para cada factor.

**Tabla III.1. Valores reales y codificados para los factores de diseño: temperatura inicial, nivel de presión y concentración de CaCl<sub>2</sub>, de acuerdo al diseño de Red de Doehlert.**

Tratamiento	Valores reales			Valores codificados		
	Temperatura inicial (°C)	Nivel de Presión (MPa)	Concentración de CaCl <sub>2</sub> (mol.L <sup>-1</sup> )	Temperatura inicial	Presión	CaCl <sub>2</sub>
1	55	600	10	0	0	0
2	55	600	10	0	0	0
3	55	600	10	0	0	0
4	55	500	10	0	-1	0
5	55	700	10	0	1	0
6	65	600	10	1	0	0
7	45	600	10	-1	0	0
8	50	550	5	-0,5	-0,5	-0,707
9	50	650	5	-0,5	0,5	-0,707
10	50	550	15	-0,5	-0,5	0,707
11	50	650	15	-0,5	0,5	0,707
12	60	550	5	0,5	-0,5	-0,707
13	60	650	5	0,5	0,5	-0,707
14	60	550	15	0,5	-0,5	0,707
15	60	650	15	0,5	0,5	0,707

Cada variable respuesta (SP, %ILOX, %IFA) fue analizada en función de los factores de diseño codificados (temperatura inicial: T, nivel de presión: P y concentración de CaCl<sub>2</sub>: CaCl<sub>2</sub>). Para representar la relación existente entre las mismas se utilizó un polinomio de segundo grado:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{i < j=2}^3 \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon$$

donde  $Y$  es la variable respuesta,  $\beta_0$  es una constante (término independiente),  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  y  $\beta_{ij}$  son los coeficientes de los términos lineal, cuadrático y mixto, respectivamente y  $x_i$  es la variable independiente (factor del diseño) codificada y  $\epsilon$  es el error experimental. La significancia de los coeficientes en las ecuaciones de cada variable respuesta obtenida por análisis de regresión múltiple fue evaluada aplicando la prueba  $F$  con  $p < 0,05$ . Las variables independientes que resultaron significativas fueron retenidas en el modelo reducido. Este último fue utilizado para generar las superficies de respuesta y las gráficas de contorno de cada variable respuesta. Todo el procesamiento de los datos se realizó con el *software* Statistica 7.0 (Stat Soft. Inc., EEUU).

Para determinar los niveles de los factores de proceso que optimizaron las variables respuesta se utilizó el método de la función deseabilidad. El mismo fue propuesto originalmente por Harrington (1965) y posteriormente mejorado por Derringer y Suich (1980) y Derringer (1994). Consiste en definir una función en el espacio de factores que estime la deseabilidad global (DG) de las respuestas en cada punto, convirtiendo el problema de optimización multivariado en univariado. De esta forma para encontrar el óptimo buscado basta con maximizar la función DG. Para definirla se requiere que todas las  $Y$  (variables respuesta) estén en la misma escala, para lo cual se debe transformar cada respuesta predicha  $\hat{Y}_i(x)$  en un valor de deseabilidad individual  $d_i(x)$  cuyo dominio es el intervalo  $[0,1]$ . De esta manera,  $d_i(x)$  mide la deseabilidad del punto  $x = (x_1, x_2, \dots, x_k)$  con respecto a la variable  $Y_i$ . La transformación  $d_i(x)$  se hace en términos de las especificaciones y del valor objetivo de cada  $Y$ . Si la variable  $Y_i$  tiene por especificaciones inferior y superior  $EL_i$  y  $ES_i$ , y su valor objetivo o nominal es  $T_i$ , se define la transformación  $d_i$  como,

$$d_i(x) = \begin{cases} [\hat{Y}_i(x) - EL_i / T_i - EL_i]^s & \text{si } EL_i \leq \hat{Y}_i(x) \leq T_i \\ [\hat{Y}_i(x) - ES_i / T_i - ES_i]^l & \text{si } T_i < \hat{Y}_i(x) \leq ES_i \\ 0 & \text{si } \hat{Y}_i(x) < EL_i \text{ o } \hat{Y}_i(x) > ES_i \end{cases}$$

donde  $s$  y  $t$  son exponentes que sirven para elegir la forma deseada de la transformación. El valor por omisión de estos exponentes es 1, lo cual sugiere un incremento lineal de la deseabilidad hacia el valor objetivo. Una vez calculadas las  $m$  deseabilidades individuales sobre el punto  $x$ , la DG de  $x$  queda definida por la media geométrica ponderada,

$$DG(x) = (d_1^{w_1} \times d_2^{w_2} \times \dots \times d_m^{w_m})^{1/\sum w_i}$$

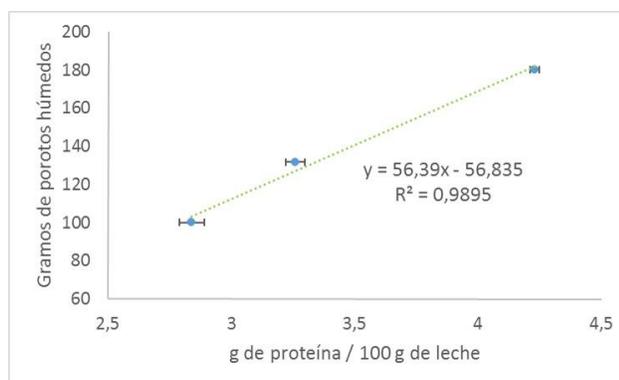
donde los pesos  $w_i$  son constantes que permiten balancear la importancia relativa de cada variable. Si todos los exponentes son igualmente importantes,  $w_i = 1$  para  $i = 1, 2, \dots, m$ , la DG toma la forma:

$$DG = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_m)^{1/m}$$

Si  $d_i$  es igual a 1 significa que la correspondiente respuesta predicha  $\hat{Y}_i(x)$  toma su valor máximo deseable. Si  $d_i$  es igual a 0 la respuesta  $\hat{Y}_i(x)$  predice un valor inaceptable y en este caso la DG es 0 independientemente de los valores de las respuestas restantes. En nuestro caso se halló la función DG mediante el software Statistica 7.0 usando como criterio la maximización de las variables respuesta que resultaron significativas en cada modelo.

### 3.1.2. Preparación de leche de soja

Las leches de soja fueron preparadas según el método descrito por Pathomrungrunggul, Lewis y Grandison (2010) con algunas modificaciones. Como materia prima se utilizaron porotos de soja no modificados genéticamente ni tratados térmicamente, variedad INTA ALIM5.09, cosechados en el año 2011 en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Marcos Juarez, Córdoba, Argentina. Porotos de soja previamente enjuagados con agua destilada fueron puestos en remojo en agua bidestilada en una proporción 1:10 masa en volumen durante 14 h a 4 °C. El agua fue eliminada por filtración. Se obtuvieron leches de soja partiendo de cantidades variables de porotos húmedos y procesados en 400 mL de agua bidestilada. Se realizó la determinación del contenido de proteína total por el método de Kjeldahl (Kjeldahl, 1883). Se graficó el porcentaje peso/peso (%p/p) de proteína total en el eje de abscisas y la masa de porotos húmedos en el eje de ordenadas. A partir de la curva obtenida (Figura III.1.) se determinó por interpolación el valor de la masa de porotos necesaria (112,3 g) para producir una leche con 3 %p/p de proteína total.



**Figura III.1.** Curva experimental utilizada para la obtención, por interpolación, de la relación poroto húmedo:agua necesaria para obtener una leche de soja con una concentración proteica 3 %p/p.

De esta manera para obtener una leche de soja con un contenido de proteína total 3 %p/p se utilizó una relación 112,3:400 masa en volumen de porotos húmedos y agua bidestilada. La mezcla fue inicialmente procesada durante 1 min a máxima velocidad con una batidora de mano modelo LM852 400 watts (ATMA, Argentina) y posteriormente con 3 ciclos de 1 min a 18000 rpm usando un homogeneizador ultraturrax modelo T-25 (IKA®, Werke GmbH & Co. KG, Alemania). El *okara* (material insoluble que resulta de la trituración de los porotos de soja) fue separado por filtración mediante tela suiza. El permeado obtenido fue enriquecido con diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  (según diseño experimental, sección 3.1.1.) a partir de una solución madre  $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  (Sigma, St. Louis, EEUU). El pH de todas las muestras se ajustó a 7,0 mediante el agregado de  $\text{NaOH } 2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ . El valor de pH fue seleccionado de acuerdo a resultados obtenidos en los capítulos I y II, en los cuales se encontró que el efecto del tratamiento con APH sobre dispersiones de APS adicionadas con calcio es mayor a valores de pH entre 7,0 y 8,0 (Manassero *et al.* 2015).

### 3.1.3. Preparación y tratamiento de las muestras

Las leches de soja fueron colocadas en botellas de polipropileno de 110 mL de capacidad, envasadas al vacío en bolsas plásticas de material multilaminado (Cryovac BB2800, Sealed Air, Buenos Aires, Argentina) y termostatizadas en un baño Thermo Scientific Lindberg/Blue M modelo RWB 3220 (Waltham, MA, EEUU), con agitación y control de temperatura. Para registrar el aumento de temperatura en función del tiempo (curva de penetración de calor) se utilizó una botella que no fue tratada con APH a la cual se le colocó, en el centro de la misma, una termocupla tipo K modelo FPG5580.035 (Stansted Fluid Power Ltd., Reino Unido)

conectada a un multímetro digital Hydra 2625A (John Fluke Mfg. Co., Inc., Everett, EEUU). Las lecturas de temperatura fueron tomadas a intervalos de 30 s con una precisión de  $\pm 0,1$  °C hasta alcanzar la temperatura inicial de la muestra correspondiente al diseño experimental (sección 3.1.1). La temperatura del baño termostático fue acondicionada 2 °C por arriba de la temperatura inicial requerida en cada caso. Posteriormente las botellas plásticas fueron colocadas en forma inmediata dentro del cilindro del equipo de APH (Stansted Fluid Power Ltd. Modelo Iso-Lab SystemFPG 9400:922, Stansted, Reino Unido). El tiempo de tratamiento en todos los casos fue de 5 min una vez alcanzado el nivel de presión de trabajo (según diseño experimental, sección 3.1.1). El fluido de compresión utilizado consistió en una mezcla de propilenglicol y agua en una relación 70:30 (v/v). La rampa de presurización (velocidad de compresión) fue de  $5 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$  y la de despresurización, de  $20 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ . La camisa de intercambio de calor del cilindro de alta presión fue acondicionada a la temperatura de proceso (temperatura durante el tratamiento con APH, alcanzada por el calentamiento por compresión) mientras que el fluido de compresión fue acondicionado mediante un intercambiador de calor de doble tubo a la temperatura inicial (misma temperatura que las muestras al ser cargadas en el cilindro de alta presión). El fluido calefactor utilizado fue acondicionado en un tanque de material polimérico (*calorifier*), calefaccionado con resistencias eléctricas, instalado en el módulo de servicio del equipo APH. Todo el sistema fue acondicionado térmicamente en forma previa al inicio de las corridas, según las condiciones que se indican en la Tabla III.2.). Estas condiciones fueron establecidas en ensayos preliminares, en los cuales se determinaron las temperaturas de proceso para los diferentes niveles de presión y temperaturas iniciales establecidos en el diseño experimental (sección 3.1.1). Las temperaturas de las muestras y del fluido de compresión fueron monitoreadas y registradas durante el tratamiento con APH mediante termocuplas tipo K modelo FPG5580.035 (Stansted Fluid Power Ltd., Reino Unido). A su vez, la temperatura del fluido calefactor en la camisa de intercambio de calor del cilindro de alta presión y del fluido de compresión en el intercambiador de calor de doble tubo fueron monitoreadas por termocuplas tipo J. Esas temperaturas son controladas por el sistema de control automático SCADA, instalado en el módulo de control del equipo APH. Debido a la convección natural del fluido de compresión que se produce en el cilindro del equipo APH se observaron zonas con temperaturas diferentes en el interior del mismo. En la zona ubicada entre el centro y la parte superior del cilindro se midieron las mayores temperaturas (Ormando *et al.* 2015a,b). Por tal motivo se seleccionó la región superior del cilindro de alta presión

(muestras ubicadas en la parte superior del canasto de aluminio) para realizar el seguimiento de la temperatura durante el tratamiento con APH. Las muestras correspondientes a esa zona de estudio fueron utilizadas para la evaluación de las diferentes variables respuesta. Debido al calentamiento por compresión se observó, en todos los casos, un aumento de temperatura durante el tratamiento con APH (ver Temperatura de Proceso en Tabla III.3.). La temperatura de proceso durante la etapa a presión constante (correspondiente al tiempo de mantenimiento, fijado en 5 min en este trabajo) se mantuvo constante debido al acondicionamiento térmico de la camisa, pudiendo ser considerada un factor en el diseño experimental. Sin embargo, se decidió utilizar en el mismo, así como para la descripción de resultados en Tablas y Figuras, la temperatura inicial de las muestras. En la Figura III.2. se presenta una gráfica típica de la evolución de temperatura y presión durante el tratamiento con APH. En la Figura III.2 se observa las evoluciones de temperaturas en las zonas superior e inferior del cilindro del equipo APH correspondiente a una corrida del presente estudio. También se observa la evolución de temperatura de la leche de soja debido al calentamiento por compresión.

**Tabla III.2. Temperaturas operativas en los fluidos correspondientes al equipo de APH de acuerdo a las temperaturas iniciales correspondientes al diseño experimental.**

Temperatura (°C)			
Diseño	Fluido calefactor en la camisa	Fluido de compresión	Fluido en el <i>calorifier</i>
45	70	45	75
50	75	50	80
55	80	55	85
60	85	60	90
65	90	65	90

Tabla III.3. Valores de la temperatura inicial, nivel de presión y concentración de CaCl<sub>2</sub> establecidas de acuerdo al diseño de Doehlert. La temperatura de proceso corresponde a la temperatura alcanzada por el calentamiento por compresión, medida durante el tiempo de mantenimiento, utilizando termocuplas tipo K.

Tratamiento	Presión (MPa)	CaCl <sub>2</sub> (mmol L <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	
			Inicial	Proceso
1	600	10	55	85,9
2	600	10	55	84,9
3	600	10	55	87,1
4	500	10	55	79,7
5	700	10	55	86,0
6	600	10	65	94,7
7	600	10	45	74,8
8	550	5	50	73,5
9	650	5	50	78,2
10	550	15	50	73,4
11	650	15	50	77,4
12	550	5	60	84,8
13	650	5	60	89,1
14	550	15	60	83,7
15	650	15	60	87,0

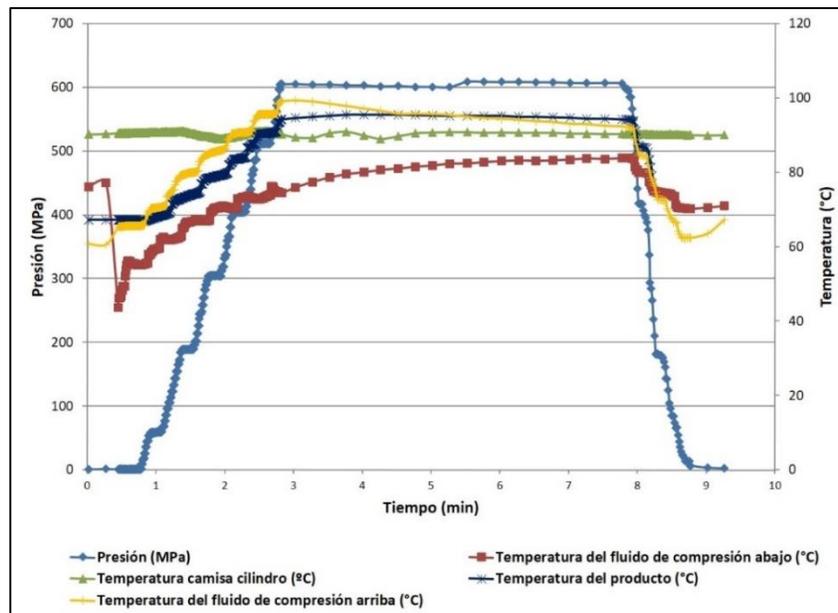


Figura III.2. Evolución de la temperatura en diferentes zonas del cilindro del equipo APH y en el producto (leche de soja) y evolución del nivel de presión correspondiente a un tratamiento con APH a 600 MPa durante 5 min a partir de una temperatura inicial de 65 °C en el producto y en el fluido de compresión. Se presenta también la temperatura de la camisa de intercambio de calor que rodea al cilindro de alta presión. Los datos provienen de una corrida correspondiente al presente estudio.

En todos los casos, una vez finalizado el tratamiento, las muestras fueron enfriadas rápidamente en un baño con agua fría y mantenidas a temperatura de refrigeración hasta su posterior análisis.

#### 3.1.4. Determinación de solubilidad proteica

La solubilidad proteica fue determinada por el método del ácido bicinónico (sección 1.1.6.3.), modificado por el agregado de 7,0 g.L<sup>-1</sup> de SDS al reactivo de trabajo. La modificación fue similar a la realizada por Markwell *et al.* (1978) sobre el método de Lowry de manera de solubilizar las proteínas que forman parte de la emulsión mediante la acción de un detergente como el SDS. Las lecturas de absorbancia fueron realizadas utilizando un lector de placas Synergy HT<sup>TM</sup> (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, EEUU) a una longitud de onda de 562 nm. Se expresó la concentración de proteína soluble (SP) en g.L<sup>-1</sup>. A su vez, se definió el porcentaje de proteína soluble (%SP) como:

$$\%SP = SP_T \times 100 / SP_C$$

Donde SP<sub>T</sub> es la solubilidad de la leche tratada (g.L<sup>-1</sup>) y SP<sub>C</sub> es la solubilidad de la leche control (sin adición de calcio y sin tratamiento alguno).

#### 3.1.5. Porcentaje de inactivación de la enzima lipoxigenasa (%LOX)

Se determinó la actividad de LOX mediante espectrofotometría continua, a través de la reacción enzimática de oxidación del ácido linoleico al correspondiente hidroperóxido, basado en los métodos utilizados por van der Ven, Matser y van den Berg (2005) y Wang, Zhou y Chen (2008) con algunas modificaciones. Como sustrato de reacción se utilizó una solución de ácido linoleico, preparada al momento de realizar la medición. La misma fue preparada mediante el agregado de 10 µL de ácido linoleico y 10 µL de emulsificante Tween 20 a 4 mL de *buffer* borato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 9,0. Se homogeneizó por agitación en *vortex* y se llevó a 60 mL con el mismo *buffer*. El oxígeno presente en la solución fue removido mediante corriente de nitrógeno.

La enzima fue extraída a partir de las muestras de leche de soja control y tratadas con la combinación APH-temperatura. El pH de las muestras fue llevado a 4,5 mediante el agregado de solución de HCl 2,0 mol.L<sup>-1</sup> y posteriormente fueron centrifugadas a 10000 g durante 10

min a 4 °C. El sobrenadante constituyó el extracto enzimático utilizado para la medición de la actividad de LOX.

La reacción se llevó a cabo en una cubeta de cuarzo termostatzada a 25 °C. Se agregaron 2 mL de solución de ácido linoleico y 0,90 mL de *buffer* borato y se mezcló por inversión. Luego se agregaron 50 µL de extracto enzimático diluido 1/20 con el mismo *buffer* y rápidamente se mezcló por inversión. Inmediatamente se midió la absorbancia a 234 nm durante 3 min en un espectrofotómetro Beckman modelo DU 650 (Beckman Instruments Ltd., California, EEUU). El blanco de reacción fue preparado con 0,95 mL de *buffer* borato y 2 mL de solución sustrato. Se definió una unidad enzimática de LOX como aquella que produce un cambio de 0,001 unidades de absorbancia por min por mL de extracto. La determinación se realizó por triplicado.

El porcentaje de actividad residual, AR (%) de LOX se definió como:

$$\text{AR (\%)} = 100 \times A / A_0$$

donde A es la actividad de LOX en las muestras tratadas y A<sub>0</sub> es la actividad inicial de LOX en las muestras control, expresadas en función de las unidades enzimáticas anteriormente descritas.

El porcentaje de inactivación de LOX (%ILOX) se calculó como:

$$\text{\%ILOX} = 100 - \text{AR (\%)}$$

#### 3.1.6. Porcentaje de inactivación de factores antitripticos (%IFA)

La actividad total de los factores antitripticos (FA) fue determinada usando el método enzimático descrito por González y Carrillo (1987) con algunas modificaciones. El mismo se basa en la medición colorimétrica de los péptidos liberados por la hidrólisis de la hemoglobina usada como sustrato siempre que la tripsina se encuentre activa.

El extracto de los FA fue obtenido a partir de las leches control y tratadas. El pH de las muestras fue llevado a 4,5 mediante el agregado de solución de HCl 2,0 mol.L<sup>-1</sup> y posteriormente fueron centrifugadas a 10000 g durante 10 min a 4 °C. Se tomaron 10 mL del sobrenadante, se ajustó el pH a 8,0 mediante el agregado de solución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se llevó a 25 mL con *buffer* fosfato pH 8,0 (45,5 mmol.L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 4,54 mmol.L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

Esta solución constituyó el extracto de los FA utilizado para la determinación de la actividad antitriptica. Como sustrato de reacción se utilizó hemoglobina bovina (Sigma, St. Louis, EEUU) 2,5 %p/v en urea 8,3 mol.L<sup>-1</sup> pH 8,0.

Para llevar a cabo el ensayo 500 µL de hemoglobina fueron incubados a 37 °C durante 10 min. Posteriormente se agregaron 50 µL del extracto de los FA en los tubos correspondientes a las muestras, y se comenzó la reacción mediante el agregado de 50 µL de solución de tripsina pancreática porcina 15 mg.mL<sup>-1</sup> (1350 unidades enzimáticas.mL<sup>-1</sup>) (Sigma, St. Louis, EEUU). Para el tubo control de actividad enzimática se sustituyeron los 50 µL de extracto de FA por 50 µL de *buffer* fosfato. Para el blanco de reacción se incorporaron inicialmente sobre los 500 µL de hemoglobina: 1 mL de ácido tricloroacético 5 %p/v y 50 µL de *buffer* fosfato, se agitó en *vortex* y posteriormente se adicionaron 50 µL de solución de tripsina. Todos los tubos fueron incubados a 37 °C durante 20 min. Luego se detuvo la reacción en los tubos control y muestra mediante el agregado de 1 mL de ácido tricloroacético 5 %p/v. Luego de 10 min todos los tubos fueron centrifugados a 16500 g durante 10 min a 25 °C. Del sobrenadante se tomaron 500 µL y se añadió 1 mL de NaOH 1,0 mol.L<sup>-1</sup> y 300 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 1:2 en agua bidestilada). Luego de 1 h de incubación a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 650 nm usando un lector de placas Synergy HT™ (BioTek Instruments, Winooski, VT, EEUU) (Figura III.3.).

El cálculo del porcentaje de inactivación de los factores nutricionales (%IFA) se realizó por triplicado como se describe a continuación:

- 100 % Actividad de tripsina =  $Abs_{control} - Abs_{blanco}$
- % Actividad de tripsina =  $(Abs_{muestra} - Abs_{blanco}) / (Abs_{control} - Abs_{blanco}) \times 100$
- % Inhibición de tripsina en la muestra = 100 - % Actividad de tripsina

Las leches de soja sin tratamiento fueron tomadas como referencia (REF) y se les atribuyó un 100 % de actividad de los FA (%FA)

- %FA =  $(\% \text{ Inhibición de tripsina en la muestra} / \text{REF}) \times 100$
- %IFA = 100 - %FA

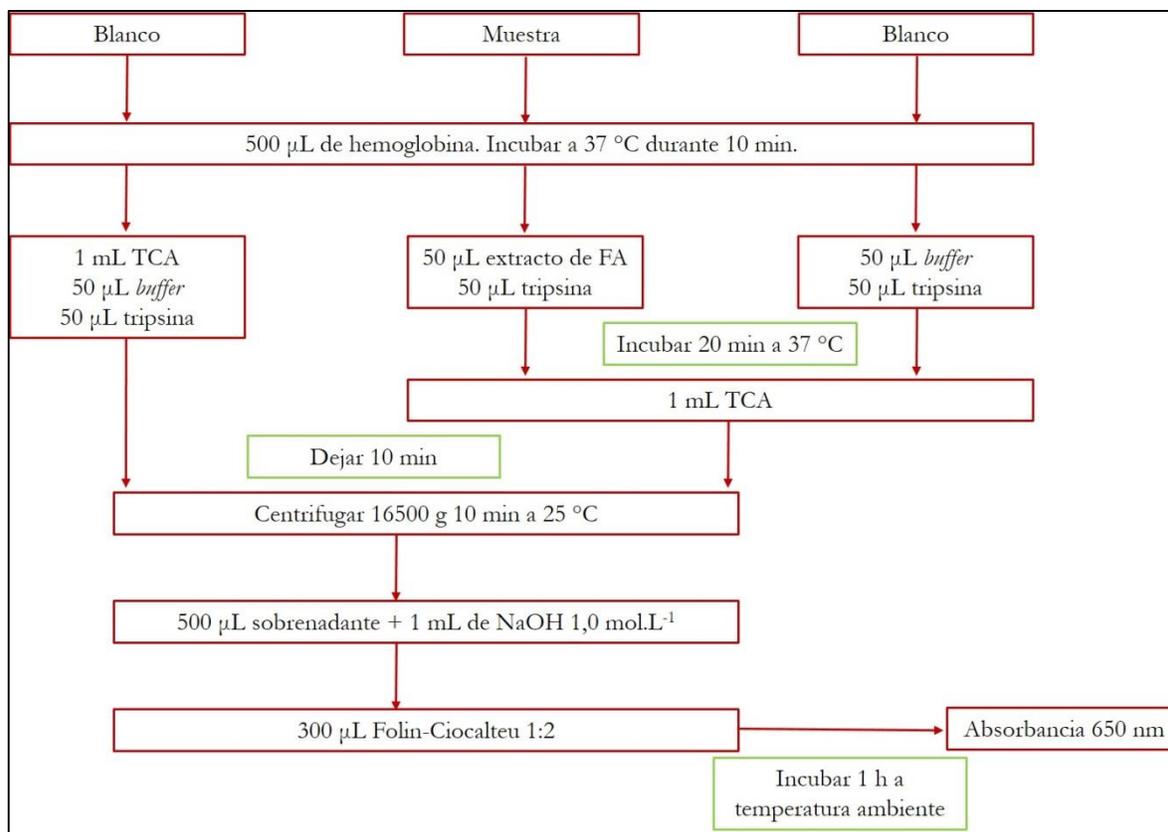


Figura III.3. Esquema del protocolo seguido para la determinación de la actividad total de los FA.

### 3.1.7. Comparación entre diversas condiciones de proceso

Con el objetivo de validar la condición óptima predicha, se realizó un tratamiento con los niveles optimizados de los factores de proceso correspondientes a la parte superior del cilindro de alta presión y se analizaron las variables respuesta obtenidas. A su vez, se analizaron parámetros asociados a la calidad de las leches de soja, tales como su viscosidad y su estabilidad física en muestras con diferentes combinaciones de los factores de proceso (concentración de calcio, temperatura, nivel de presión) que pudieran ser útiles para comparar los efectos individuales y combinados: leche control (sin ningún tratamiento y sin agregado de calcio), leche con calcio sin ningún otro tratamiento, leche con calcio tratada térmicamente, leche con calcio tratada con APH a temperatura ambiente y leche con calcio tratada con la combinación de APH y temperatura. En todos los casos en los que no se indicó lo contrario, la concentración de calcio, la temperatura y el nivel de presión utilizados fueron los predichos a través de la optimización del diseño de Red de Doehlert. Los tratamientos para la validación del modelo y la comparación entre las distintas condiciones fueron realizados por triplicado y

se analizaron diferencias estadísticas entre las medias de los diferentes tratamientos mediante el test de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

#### 3.1.7.1. Determinación de la viscosidad aparente

Aunque la reología de los alimentos estudia su deformación y comportamiento de flujo en condiciones bien definidas, se ha demostrado que existe una estrecha correlación con la textura de los mismos (Bourne, 2002), en particular con los alimentos líquidos o semi-sólidos (McKenna, 2003). El comportamiento reológico de los alimentos influye notoriamente sobre la percepción en la boca (en inglés *mouthfeel*) por parte de los consumidores. El *mouthfeel* se define como el conjunto de sensaciones que ocurren sobre la mucosa oral durante la ingestión de un alimento o bebida (Matz, 1962). Estas sensaciones dependen de la densidad, viscoelasticidad, tensión superficial y otras propiedades físicas del producto (McKenna, 1990; McKenna y Lyng, 2013). A su vez, la viscosidad no solo modifica la textura de los alimentos, sino que además le imparte estabilidad al reducir la velocidad de sedimentación o cremado de las partículas que componen el mismo (McClements, 2005).

##### 3.1.7.1.1. Metodología

Se midió la viscosidad aparente a 20 °C usando un reómetro HAAKE RheoStress 6000 (Thermo Electron Corporation, Alemania) utilizando el sistema de cilindros concéntricos. El cilindro interno describe un cono en su extremo inferior (rotor cilíndrico Z34 DIN de 34 mm de diámetro) mientras que el cilindro externo fue de fondo plano. El volumen aproximado de leche utilizado fue de 21 mL. Las muestras fueron acondicionadas térmicamente durante 1 min y posteriormente se registró la viscosidad aparente ( $\eta$ ) incrementando la velocidad de deformación desde 100 a 500 s<sup>-1</sup> en 60 s, manteniéndolo a 500 s<sup>-1</sup> por 90 s y disminuyendo el mismo de 500 a 100 s<sup>-1</sup> en 60 s. Se graficó  $\eta$  en función de la velocidad de deformación y se informó el valor de la misma a 400 s<sup>-1</sup>. Velocidades de deformación entre 10 y 10<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> son utilizadas normalmente en el procesamiento de alimentos durante el mezclado y/o la agitación (Steffe, 1996). A su vez, Chen *et al.* (2015) trabajaron con velocidades de deformación similares, pero con un arreglo geométrico distinto, en la evaluación de la viscosidad aparente de jugos de papaya.

3.1.7.2. Análisis de estabilidad física

Se estudió la estabilidad física de muestras de leche de soja sometidas a diferentes tratamientos. Para su comparación se seleccionaron las muestras en las cuales se encontró efecto del tratamiento sobre la propiedad estudiada (Tabla III.4.).

**Tabla III.4. Muestras de leches de soja sometidas a diferentes tratamientos térmicos o APH-temperatura sobre las cuales se determinó la estabilidad física**

Muestras	
Concentración de $\text{CaCl}_2$ : 10 $\text{mmol.L}^{-1}$	Concentración de $\text{CaCl}_2$ : 15 $\text{mmol.L}^{-1}$
Temperatura Ambiente-0,1 MPa	Temperatura Ambiente-0,1 MPa
85 °C - 0,1 MPa	80 °C - 0,1 MPa
95 °C - 0,1 MPa	90 °C - 0,1 MPa
$T_i$ : 55 °C (79,7 °C) - 500 MPa	$T_i$ : 50 °C (77,4 °C) - 650 MPa
$T_i$ : 65 °C (94,7 °C) - 600 MPa	$T_i$ : 60 °C (83,7 °C) - 550 MPa

Las temperaturas entre paréntesis corresponden a las temperaturas de proceso medidas durante el tratamiento combinado APH-temperatura. En los tratamientos térmicos se utilizaron temperaturas equivalentes a las de proceso en el tratamiento combinado APH-temperatura.  $T_i$ : temperatura inicial

3.1.7.2.1. Metodología

Para evaluar la estabilidad física se colocaron 10 mL de leche dentro de tubos de vidrio transparente de 13 mm de diámetro, los cuales fueron almacenados a 4 °C durante el tiempo que duró la medición. La estabilidad física se estimó como la relación (*ratio*) entre la longitud del frente de separación superior en relación a la longitud total de la muestra a los 0, 1 y 5 días posteriores a los tratamientos aplicados. La transparencia de la fase superior fue clasificada a ojo desnudo en 4 niveles (sin separación, turbio, traslúcido o transparente) como una medida indirecta del grado de sedimentación.

### 3.2. Resultados y discusión

#### 3.2.1. Efecto sobre solubilidad proteica

En la Tabla III.5. se presentan los coeficientes de regresión, los estadísticos  $R^2$  y valor  $p$  correspondientes al modelo y las ecuaciones reducidas para las variables respuesta solubilidad proteica (SP), porcentaje de inactivación de lipoxigenasa (%ILOX) y de los factores antinutricionales (%IFA) de leches de soja adicionadas con calcio tratadas con APH y temperatura. Las tablas correspondientes al ANOVA de las variables respuesta (SP) y (%IFA) se presentan en el Anexo del Capítulo III (sección 3.4.).

Tabla III.5. Coeficientes de regresión, análisis de varianza del modelo y ecuaciones reducidas para las variables respuesta solubilidad proteica (SP), porcentaje de inactivación de lipoxigenasa (%ILOX) y de los factores antinutricionales (%IFA) de leches de soja adicionadas con calcio tratadas con APH y temperatura.

Términos	Variables respuesta			
		SP	%ILOX	%IFA
Constante		23,3666***	99,05	96,933****
Lineal	CaCl <sub>2</sub>	-4,950**	-0,081	2,000
	P	0,763	0,191	6,894**
	T	-0,425	0,241	9,787***
Cuadrático	CaCl <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-5,333*	0,113	-0,729
	P <sup>2</sup>	-1,004	0,063	-3,102*
	T <sup>2</sup>	-0,904	0,194	-5,827**
Interacciones	CaCl <sub>2</sub> x T	-1,600	-0,006	2,163
	T x P	-0,200	-0,244	-6,737*
	CaCl <sub>2</sub> x P	0,375	0,081	-1,475
$R^2$		0,93	0,07	0,97
Valor $p$		***	NS	***
<b>Ecuaciones reducidas para las variables respuesta (valores codificados)</b>				
<b>SP = 21,1857 - 4,950 CaCl<sub>2</sub> - 5,061 CaCl<sub>2</sub><sup>2</sup></b>				
<b>%IFA = 96,185 + 9,787 T - 5,799 T<sup>2</sup> + 6,894 P - 3,074 P<sup>2</sup> - 6,737 T x P</b>				
<b>CaCl<sub>2</sub>: Concentración de cloruro de calcio, P: Nivel de presión, T: Temperatura inicial</b>				
<b>Niveles de significancia: *p&lt;0,05; **p&lt;0,01; ***p&lt;0,005; ****p&lt;0,0005; NS: no significativo</b>				

Los coeficientes de regresión estimados para la variable SP fueron obtenidos a través del análisis de regresión múltiple de las respuestas obtenidas. El modelo resultó significativo ( $p < 0,005$ ) y explicó el 93 % de las respuestas observadas ( $R^2 = 0,93$ ). La SP fue modificada significativamente por la concentración de CaCl<sub>2</sub>, disminuyendo linealmente ( $p < 0,01$ ) y cuadráticamente ( $p < 0,05$ ) con el incremento de este factor (Tabla III.5.). No se observaron efectos significativos del nivel de presión ni de la temperatura inicial dentro del rango

estudiado, tampoco resultaron significativas las interacciones entre estos factores. En la Figura III.4. se presenta la superficie de respuesta para SP en función de la concentración de  $\text{CaCl}_2$  y del nivel de presión aplicado.

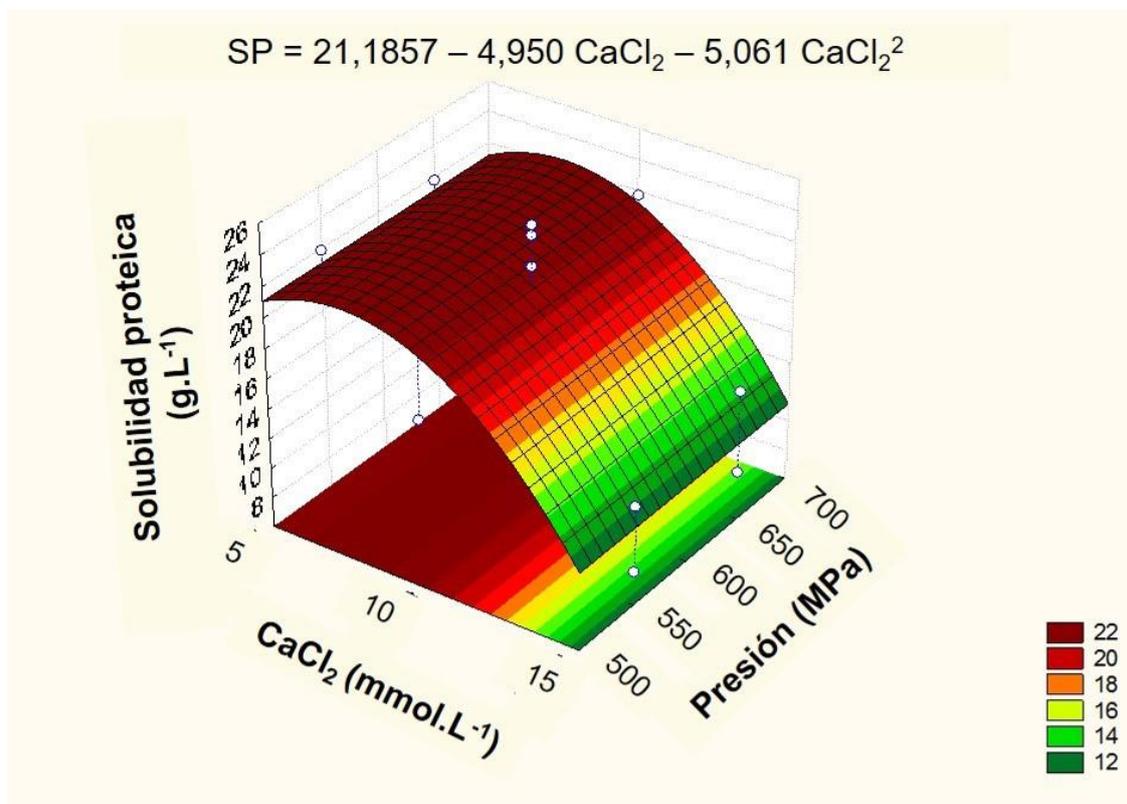


Figura III.4. Superficie de respuesta correspondiente a la solubilidad proteica (SP) en función de la concentración de  $\text{CaCl}_2$  y del nivel de presión. -o- Valores experimentales.

El menor valor de SP ( $15,15 \text{ g.L}^{-1}$ ; 50,5 % relativo al total de proteína) fue observado en la condición con la mayor concentración de  $\text{CaCl}_2$  adicionada (Figura III.4.). Este resultado coincide con lo observado en dispersiones de APS en agua bidestilada (Capítulo I) y en *buffers* (Capítulo II), en las que, los iones divalentes como el  $\text{Ca}^{+2}$ , provocaron insolubilización de las proteínas de soja por unión a sus cargas negativas y/o restos de histidina (Appu Rao & Narasinga Rao, 1976; Kroll, 1984).

La adición de calcio a leches de soja normalmente representa un problema debido a la coagulación proteica. Una estrategia para evitar este fenómeno que genera una disminución en el porcentaje de proteína soluble es la adición de agentes secuestrantes, como el hexametáfosfato o citrato sódico, que evitan o disminuyen la coagulación y precipitación de complejos proteína-calcio (Yazici *et al.* 1997; Pathomrungruangsyounggul, Grandison & Lewis, 2007). Estos autores también encontraron que la disminución de la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$ ,

debida a la presencia de los agentes secuestrantes, disminuyó el grado de insolubilidad y sedimentación de las proteínas, pero afectó características que podrían comprometer la aceptación del producto, como por ejemplo la disminución de su viscosidad. En nuestro estudio el efecto solubilizante y estabilizante de la aplicación de APH no estaría acompañado por cambios irreversibles en la concentración de ion calcio libre (Manassero *et al.* 2015), por lo tanto, el uso de APH podría representar una estrategia ventajosa para aumentar la SP, disminuyendo o eliminando el uso de ciertos aditivos como los anteriormente mencionados. En nuestro caso no se observó efecto del nivel de presión debido a que las presiones aplicadas fueron suficientemente altas como para revertir la insolubilización producida por la adición de calcio. Añón, de Lamballerie y Speroni (2012) encontraron diferencias en la magnitud del efecto sobre la solubilidad proteica producido por la aplicación de APH entre 400 MPa y 600 MPa, siendo mayor el efecto a 600 MPa. Probablemente en nuestro caso se haya alcanzado un *plateau* en el rango ensayado (500 MPa – 700 MPa).

El rango de temperatura estudiado tampoco mostró efecto sobre la SP. Las proteínas de soja son muy sensibles al tratamiento térmico (Wagner & Añón, 1990), el efecto combinado de la aplicación de niveles de presión en el rango 500 MPa – 700 MPa y temperaturas en el rango 75 °C – 95 °C, posiblemente conduzcan a elevados e indistinguibles grados de desnaturalización de las proteínas. El rango de presión utilizado es suficientemente alto para alcanzar *ca.* 75 y 100 % de desnaturalización en  $\beta$ -conglucina y glicinina, respectivamente, cuando es aplicado a temperatura ambiente (Speroni, Añón & de Lamballerie, 2010). Por otra parte, las temperaturas de desnaturalización de  $\beta$ -conglucina y glicinina se encuentran dentro del rango de las temperaturas de proceso alcanzadas durante los diferentes tratamientos (Hermansson, 1978; Wagner & Añón, 1990). Cruz *et al.* (2007) reportaron un grado de desnaturalización del 100 % en leches de soja tratadas mediante homogeneización por ultra alta presión a 300 MPa y una temperatura alcanzada durante el tratamiento de 104 °C. Más aun, la termo-estabilización inducida por la presión que puede ocurrir en algunos tipos de proteínas fueron verificadas hasta *ca.* 100 MPa. Por encima de estos niveles de presión la combinación APH-temperatura conduce al desplegamiento de las proteínas (Sun *et al.* 2001). Teniendo en cuenta lo informado en bibliografía, se podría inferir que las proteínas presentes en las leches de soja se encontraron completamente desnaturalizadas en todos los tratamientos estudiados. Esto estaría relacionado con la falta de efecto del nivel de presión, de la temperatura o su combinación sobre la SP.

### 3.2.2. Efecto sobre la inactivación de la enzima lipoxigenasa

Ninguno de los factores del diseño resultó significativo ( $p > 0,05$ ) para %ILOX en los rangos estudiados (Tabla III.5.). Los valores de %ILOX estuvieron comprendidos entre 98,3 % (15 mmol.L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 550 MPa, 50 °C) y 100 % (5 o 15 mmol.L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 550 o 650 MPa, 60 °C). La inactivación de LOX fue en todos los casos de gran magnitud y prácticamente constante, con independencia de la presión, de la concentración de calcio y de la temperatura utilizadas. En consecuencia, no se detectó actividad residual de LOX en la mayoría de las combinaciones presión-temperatura estudiadas. Entonces el producto obtenido sería sensorialmente aceptable y sin desarrollo de *off-flavors* asociados a la oxidación enzimática de lípidos.

Los altos valores de inactivación de LOX observados en el presente estudio podrían ser explicados a partir de datos previos informados en bibliografía: Heinisch *et al.* (1995) estudiaron la actividad y estructura de LOX mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier y observaron cambios conformacionales irreversibles cuando la enzima fue tratada a 600 MPa a temperatura ambiente. Tangwongchai, Ledward y Ames (2000) informaron que el tratamiento a 600 MPa y 45 °C (temperatura máxima alcanzada durante el proceso medida en el fluido de compresión) produjo la inactivación irreversible de LOX. Seyderhelm *et al.* (1996) clasificaron a LOX como una enzima sensible a la presión y encontraron que su actividad disminuía notablemente al ser tratada a 600 MPa y 25 °C durante 2 min tanto en *buffer* TRIS a pH 7,0 como en leche de soja. Más aun, Wang, Zhou y Chen (2008) informaron que la combinación de alta presión en el rango 200 a 650 MPa y temperatura en el rango 5 a 60 °C produjo la inactivación irreversible de LOX en leches de soja.

Los resultados informados en bibliografía respaldan los observados en el presente trabajo, indicando que la enzima LOX se encuentra completamente inactivada en las muestras tratadas con las combinaciones presión-temperatura estudiadas. Resulta importante señalar que la incorporación de calcio, para ninguna de las concentraciones estudiadas, tuvo efecto sobre la inactivación de LOX.

### 3.2.3. Efecto sobre la inactivación de los factores antinutricionales

Los coeficientes de regresión estimados para la variable %IFA fueron obtenidos a través del análisis de regresión múltiple de las respuestas obtenidas (Tabla III.5.). El modelo resultó significativo ( $p < 0,005$ ) y explicó el 97 % de las respuestas observadas ( $R^2 = 0,97$ ).

En la Tabla III.5. también se observa que tanto el nivel de presión como la temperatura inicial afectaron significativamente el valor del %IFA. El %IFA aumentó linealmente con el incremento de la presión ( $p < 0,01$ ) y de la temperatura inicial ( $p < 0,005$ ), y disminuyó cuadráticamente con el incremento de la presión ( $p < 0,05$ ) y de la temperatura inicial ( $p < 0,01$ ). Adicionalmente, la interacción entre el nivel de presión y la temperatura inicial resultó significativo ( $p < 0,05$ ). El factor concentración de calcio no tuvo efecto significativo sobre el %IFA. En la Figura III.5. se presenta la superficie de respuesta para %IFA en función de la temperatura inicial y del nivel de presión.

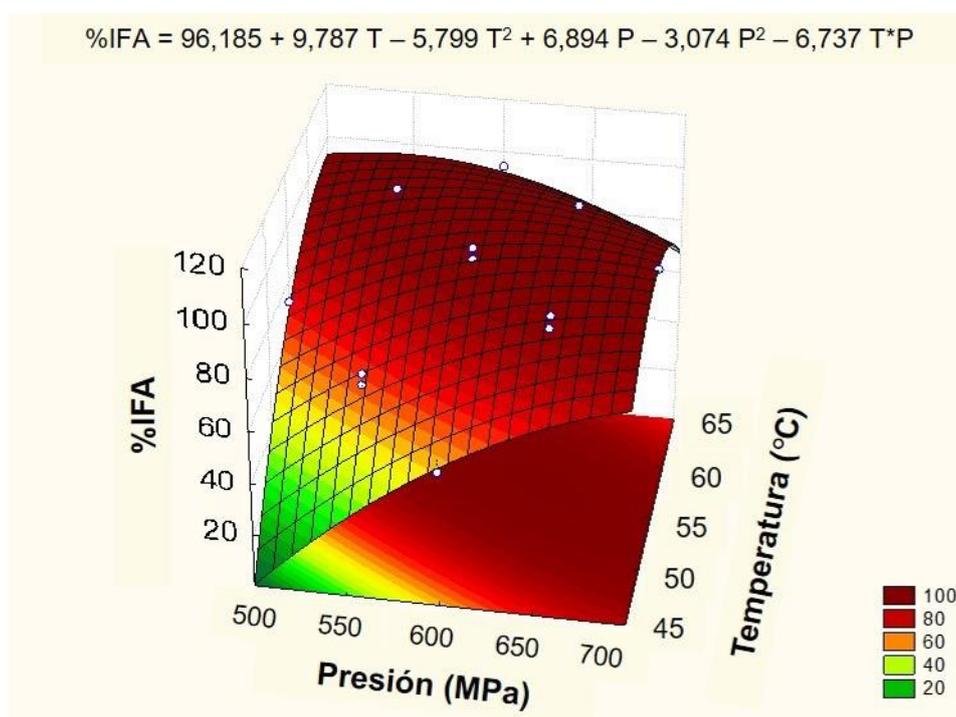


Figura III.5. Superficie de respuesta que muestra el efecto de la temperatura inicial y del nivel de presión sobre el porcentaje de inactivación de los factores antinutricionales (%IFA). -o- Valores experimentales.

Ambos inhibidores de tripsina exhiben una alta resistencia térmica debido a la presencia de puentes disulfuro (DiPietro & Liener, 1989): dos en el inhibidor de Kunitz y siete en el de Bowman-Birk. Birk (1961) reportó que una solución acuosa de un extracto purificado del inhibidor de Bowman-Birk permaneció estable luego de un tratamiento a 100 °C durante 10 min. Sorgentini y Wagner (1999) determinaron la temperatura de desnaturalización del inhibidor de Kunitz (76 °C) y del inhibidor de Bowman-Birk (el cual presentó dos temperaturas de desnaturalización, 77 °C y 110 °C).

El rango de valores experimentales de %IFA (ver círculos vacíos, Figura III.5.) estuvo comprendido entre 51,9 % (10 mmol.L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 600 MPa, 45 °C) y 100 % (15 mmol.L<sup>-1</sup>

CaCl<sub>2</sub>, 550 o 650 MPa, 60 °C). En el centro del diseño (10 mmol.L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 600 MPa, 55 °C) la inactivación promedio fue 96,7 %. A su vez, tratamientos como 10 mmol.L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 700 MPa, 55 °C; 10 mmol.L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 600 MPa, 65 °C; 5 mmol.L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 650 MPa, 50 °C y 5 mmol.L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 650 MPa, 60 °C causaron la inactivación de más del 90 % de los factores antitripticos. Observando las curvas de nivel del plano inferior de la Figura III.5. se establece que para la mayoría de las combinaciones nivel de presión-temperatura inicial, el %IFA es superior al 60%, con excepción de los rangos 500 - 550 MPa y 45 - 50 °C, para cuyas combinaciones el %IFA estuvo entre 20 % y 40%.

Sales como CaCl<sub>2</sub> y NaCl pueden incrementar o disminuir (dependiendo del nivel de presión) la sensibilidad de algunas proteínas de soja a la desnaturalización inducida por la aplicación de altas presiones (Speroni, Añón & de Lamballerie, 2010; Añón, de Lamballerie & Speroni, 2011). Es por ello que uno de los factores incluidos en el diseño de optimización del tratamiento combinado APH-temperatura de leches de soja fue la concentración de CaCl<sub>2</sub>. Normalmente los métodos convencionales utilizados en el procesamiento de soja utilizan altas temperaturas durante tiempos prolongados para alcanzar una reducción de al menos el 90 % en los factores antitripticos (Van Buren *et al.* 1964; Liu, 1997; Kwok, Liang & Niranjana, 2002). En el presente trabajo, varios de los tratamientos combinados aplicados permitieron obtener leches de soja aceptables desde el punto de vista de la inactivación de los factores antinutricionales. El inhibidor de Bowman-Birk presenta varios sitios de unión a iones divalentes (Losso *et al.* 2004); la asociación de iones calcio podría incrementar su sensibilidad frente al tratamiento aplicado, permitiendo alcanzar la inactivación completa observada. De esta manera, la presencia de los iones calcio, junto al mayor tiempo de tratamiento combinado aplicado (5 min *vs.* < 2 min) podrían explicar el mayor valor de %IFA obtenido en este estudio en relación al informado por van der Ven, Matser & van den Berg (2005).

#### 3.2.4. Optimización de los factores de proceso utilizando la función deseabilidad

Los valores óptimos de los factores de proceso son aquellos que maximizan los valores de SP y del %IFA. La función deseabilidad fue obtenida siguiendo este criterio. Para definirla fueron fijados los límites inferior y superior para cada variable respuesta a partir de los datos experimentales. En la Figura III.6. se muestran los perfiles de la función deseabilidad individual para cada variable respuesta y de la función deseabilidad global.

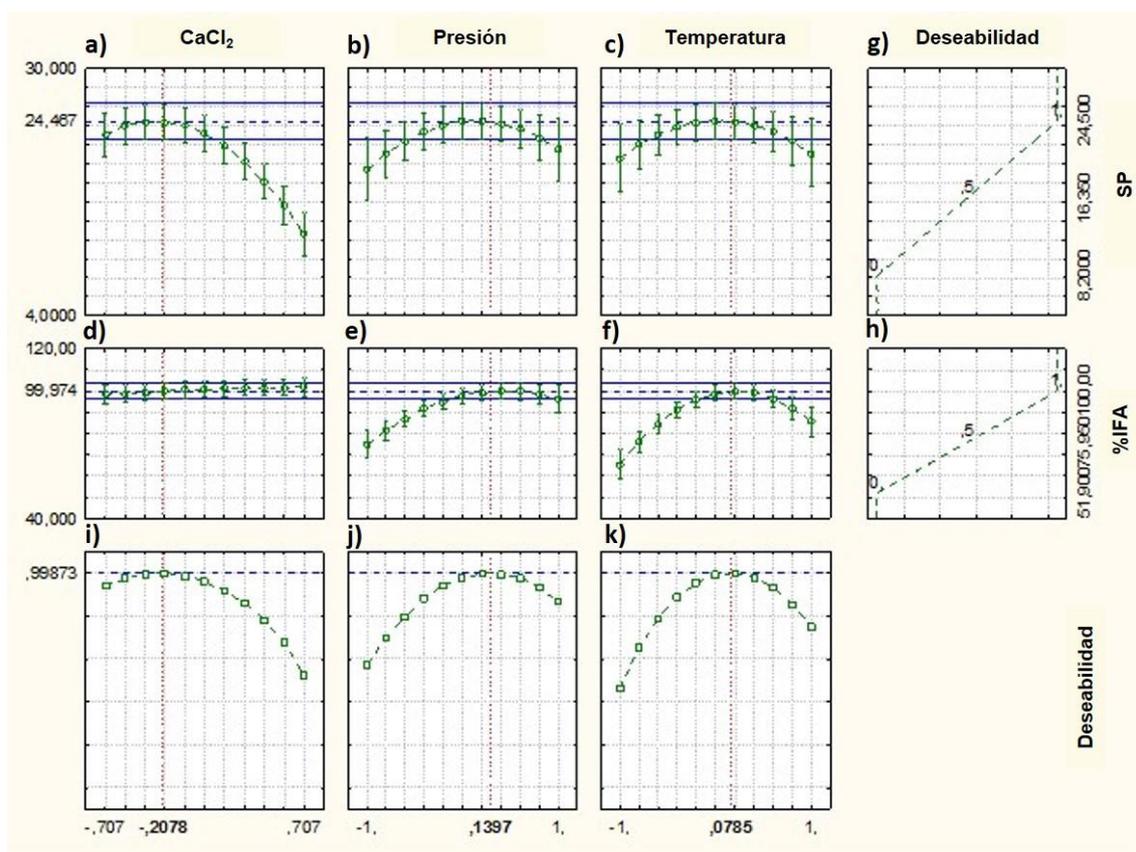


Figura III.6. Optimización simultánea de las condiciones de proceso de leches de soja adicionadas con  $\text{CaCl}_2$  tratadas con la combinación de APH y temperatura. Paneles a) - f): perfiles predichos para las variables SP y %IFA a diferentes niveles para cada factor de diseño (concentración de  $\text{CaCl}_2$ , nivel de presión y temperatura inicial) manteniendo el nivel de los otros factores constante en el valor óptimo estimado. Paneles g) y h): perfiles predichos para cada función deseabilidad individual. Paneles i) - k): perfiles para la función deseabilidad global.

Los valores codificados de los factores de diseño que llevaron a un valor de deseabilidad global máximo ( $D=0,99873$ ) fueron los siguientes: concentración de  $\text{CaCl}_2 = -0,2078$ , nivel de presión =  $0,1397$  y temperatura inicial =  $0,0785$  (Figura III.6.; paneles i-k)). Los valores reales para cada uno de los factores de diseño fueron: concentración de  $\text{CaCl}_2 = 8,53 \text{ mmol.L}^{-1}$ , nivel de presión =  $614 \text{ MPa}$  y temperatura inicial =  $55,8 \text{ }^\circ\text{C}$ . En esta condición de procesamiento (combinación de los valores óptimos de los factores de diseño) los valores predichos para las variables respuesta fueron:  $24,467 \text{ g.L}^{-1}$  para SP (Figura III.6., paneles a)-c)) y  $99,974 \%$  para %IFA (Figura III.6., paneles d)-f)).

En relación a la calidad higiénica que dicho tratamiento podría generar Smith, Mendonca y Jung (2009) ensayaron condiciones similares ( $400 \text{ MPa} - 600 \text{ MPa}$ , temperatura inicial  $75 \text{ }^\circ\text{C}$ ) mientras que Poliseli-Scopel *et al.* (2012) utilizaron condiciones con menor requerimiento energético ( $200 \text{ MPa}$ , temperatura de ingreso  $55$  o  $75 \text{ }^\circ\text{C}$ ) sobre leches de

soja e informaron un incremento en la vida útil debido a una disminución en los recuentos de bacterias totales, psicrótrofas y *Enterobacteriaceae*. De esta manera, el tratamiento de leches de soja en las condiciones óptimas obtenidas por nuestro modelo generaría un producto con vida útil extendida desde el punto de vista microbiológico.

### 3.2.5. Comparación entre diversas condiciones de proceso

Con el objetivo de validar las condiciones óptimas de proceso obtenidas mediante la función deseabilidad y de distinguir, en forma separada, los posibles efectos que producen la aplicación de APH y el tratamiento térmico, se prepararon leches de soja sin agregado de calcio y sin tratamiento (leche control) y leches adicionadas con 8,53 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> y sin tratamiento. Además, las leches adicionadas con calcio fueron sometidas a diferentes tratamientos: tratamiento térmico (85,8 °C) a presión atmosférica (0,1 MPa) durante 10 min (duración promedio del tratamiento con APH), tratamiento combinado APH y temperatura (614 MPa, 85,8 °C) o tratamiento APH a temperatura ambiente (614 MPa, 33,8 °C) (Tabla III.6.). En el caso del tratamiento térmico a presión atmosférica la temperatura (85,8 °C) corresponde a la alcanzada en el tratamiento combinado APH y temperatura debido al calentamiento por compresión (temperatura de proceso).

**Tabla III.6. Porcentaje de proteína soluble respecto a la leche control (%SP), porcentajes de inactivación de la enzima lipoxigenasa (%ILOX) y de los factores antinutricionales (%IFA) y viscosidad aparente ( $\eta$ ) de leches adicionadas con calcio sometidas a diferentes combinaciones de tratamientos.**

Tratamiento	%SP	%ILOX	%IFA	$\eta$ (cP)
Control	100,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>d</sup>	3,7 ± 0,1 <sup>d</sup>
8,53 mmol L <sup>-1</sup>	56,3 ± 2,3 <sup>d</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>d</sup>	4,8 ± 0,1 <sup>b</sup>
8,53 mmol L <sup>-1</sup> , 85,8 °C	59,6 ± 5,4 <sup>c,d</sup>	100,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	69,1 ± 0,8 <sup>b</sup>	5,8 ± 0,2 <sup>a</sup>
8,53 mmol L <sup>-1</sup> , Temp. Inicial: 55,8 °C, Temp. Proceso.: 85,8 °C, 614 MPa	71,9 ± 3,9 <sup>c</sup>	100,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	100,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	4,5 ± 0,1 <sup>c</sup>
8,53 mmol L <sup>-1</sup> , Temp. Inicial: 5 °C, Temp. Proceso: 33,8 °C, 614 MPa	87,2 ± 1,4 <sup>b</sup>	98,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	3,1 ± 0,8 <sup>c</sup>	4,4 ± 0,1 <sup>c</sup>

El control corresponde a una muestra de leche de soja sin adición de calcio y sin tratamiento. Los valores de concentración de CaCl<sub>2</sub>, temperatura inicial y nivel de presión corresponden a los valores óptimos de los factores de proceso obtenidos mediante la función deseabilidad. Los valores se expresaron como la media ± desvío estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.5.1. Efecto sobre %SP, %LOX y %IFA

Los mayores valores de %SP se observaron en las leches de soja control y en las leches adicionadas con calcio tratadas con APH a temperatura ambiente (Tabla III.6.). La combinación de APH y temperatura produjo un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en el %SP en relación a las muestras adicionadas con calcio sin tratamiento (71,9 *vs.* 56,3 %) (Tabla III.6.). Los datos sugieren que el tratamiento térmico podría interferir parcialmente con el efecto solubilizante de la aplicación de APH (71,9 *vs.* 87,2 %) (Tabla III.6.). Sin embargo, aún con tratamientos térmicos a alta temperatura pudo evidenciarse el efecto de las APH sobre la solubilidad proteica, incluso en una matriz tan compleja como la leche de soja. Esto difiere de lo observado por Zhang *et al.* (2005) quienes informaron que el tratamiento de leches de soja adicionadas con  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  con APH (entre 400 y 600 MPa) a temperatura ambiente producía su coagulación y la consecuente formación de *tofu*. Estas diferencias podrían ser atribuidas a diversos factores: por un lado, la concentración proteica utilizada por esos autores es mayor que en el presente estudio (44 *vs.* 30  $\text{g.L}^{-1}$ ). Adicionalmente, el agregado de calcio produce la disminución del pH (Kroll, 1984) favoreciendo la coagulación de la leche de soja. En este trabajo el valor del pH fue ajustado a 7,0 luego del agregado de  $\text{CaCl}_2$ .

En el presente estudio la combinación de APH y temperatura produjo la inactivación completa de los factores antinutricionales presentes en las leches de soja (100 %IFA), mientras que se alcanzó una inactivación parcial de los mismos (69,1 %IFA) con el tratamiento térmico (Tabla III.6.). Las leches adicionadas con calcio tratadas con APH a temperatura ambiente presentaron bajos valores de %IFA (3,1 %, Tabla III.6.). Estos resultados sugieren que tanto la presión como la temperatura estarían actuando sinérgicamente en la inactivación de los factores antinutricionales, y concuerdan con los informados por van der Ven, Matser y van den Berg (2005) quienes estudiaron el efecto del tratamiento combinado APH y temperatura en leches de soja sin adición de calcio. Por su parte, la enzima LOX fue completamente inactivada tanto en las muestras tratadas térmicamente como en las tratadas con APH y temperatura (100 %ILOX, Tabla III.6.) Incluso el tratamiento con APH a temperatura ambiente produjo un alto grado de inactivación (98,7 %ILOX, Tabla III.6.). Estos resultados sugieren que LOX es más sensible a los tratamientos estudiados que los factores antitripticos. No obstante, ambos resultaron completamente inactivados con la aplicación del tratamiento combinado APH y temperatura en las leches adicionadas con  $\text{CaCl}_2$ .

El calentamiento por compresión provocó un incremento de temperatura en un rango de 23 – 32 °C. Este calentamiento contribuyó con los efectos observados permitiendo alcanzar en forma cuasi instantánea las temperaturas de desnaturalización de los factores antinutricionales y la enzima. El calor se genera internamente debido al proceso de compresión y no requiere de gradientes térmicos para inducir la transferencia de energía y su generación es cuasi instantánea. Ello posibilita que el calentamiento se realice en un tiempo muy corto, lo que permitiría preservar las propiedades nutricionales y sensoriales de los productos. Si bien esto requiere confirmación mediante estudios específicos, los cuales no fueron realizados en el presente trabajo, los trabajos previos publicados por Poliseli-Scopel *et al.* (2013, 2014) respaldarían esa propuesta, ya que estos autores observaron que la homogenización por ultra-alta presión no afectó en general las características sensoriales y nutricionales de las leches de soja. Adicionalmente, ellos informaron que las leches sometidas a ese proceso no presentaron diferencias con las leches pasteurizadas e incluso tuvieron mejor aceptación, desde el punto de vista sensorial, que estas últimas.

#### 3.2.5.2. Determinación de la viscosidad aparente

Se midió la viscosidad de leches de soja sometidas a diferentes tratamientos (Tabla III.6). La adición de calcio produjo un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) en la  $\eta$  de las muestras sin tratamiento, probablemente debido a la formación de agregados solubles e insolubles. Resultados similares fueron informados por Marquez *et al.* (2015) en una bebida en base a soja de composición similar a nuestras leches, luego de la incorporación de cloruro o lactado de calcio. Las leches adicionadas con calcio y tratadas térmicamente fueron las que presentaron el valor mayor de  $\eta$  (5,8 cP, Tabla III.6.). En estas muestras la temperatura indujo el desplegamiento de las proteínas que al unirse con el calcio promovió la formación de macro-agregados de mayor peso molecular que los existentes en las muestras sin tratamiento (Yamauchi, Yamagishi y Iwabuchi, 1991). Bernat *et al.* (2015) encontraron que el calentamiento de leches de almendra (sometidas o no a un proceso de homogeneización) incrementó el valor de  $\eta$  y lo asociaron a un proceso de gelificación débil promovido por el tratamiento térmico. Adicionalmente esos autores informaron que la fracción de fibra soluble presente podría contribuir también al incremento de  $\eta$  debido a la extensión e hidratación de las cadenas del polímero inducida por la temperatura. Las leches adicionadas con calcio y tratadas con APH (tanto a temperatura inicial de 5 °C como de 55,8 °C) mostraron valores significativamente ( $p < 0,05$ ) menores de viscosidad que las leches adicionadas con calcio sin tratamiento (Tabla III.6.). Este efecto podría estar relacionado

con la ruptura de agregados de gran tamaño a partir de los cuales se generarían agregados más pequeños y mayormente solubles, como se observó en el Capítulo II de este trabajo. El tratamiento con APH estabiliza ciertos agregados, pero éstos serían más pequeños que los obtenidos por tratamiento térmico (Poliseli-Scopel *et al.* 2012). Vale la pena señalar que al utilizar tratamientos combinados con APH y temperatura (inicial 55,8 °C y de proceso 85,8 °C), la  $\eta$  resultó indistinguible de la correspondiente al tratamiento con APH a temperatura ambiente (temperatura inicial 5 °C y de proceso 33,8 °C), sugiriendo que las altas presiones controlan la estructura y/o el tamaño de los agregados. Aunque los cambios en la  $\eta$  fueron pequeños (Tabla III.6.), reflejan diferentes mecanismos de agregación. Lakshmanan, de Lamballerie y Jung (2006), trabajaron con leches de soja a pH 7,0 sin adición de calcio e informaron un aumento en la  $\eta$  luego de tratarla térmicamente. Sin embargo, esos autores no observaron cambios en la viscosidad de la leche de soja luego de tratamientos a 500 o 600 MPa, posiblemente debido a la formación de diferentes agregados. No obstante, los mismos autores encontraron un aumento en la  $\eta$  de las leches a pH 6,0, sometidas a los mismos tratamientos con APH. Zhang *et al.* (2005) informaron un incremento en la  $\eta$  de leches de soja sin adición de calcio al pH natural de la misma (6,5) luego de tratarlas con APH. A partir de los antecedentes presentados podríamos inferir que el pH tendría una influencia importante sobre el efecto de APH en la viscosidad de la leche de soja.

La leche de soja es una matriz compleja formada por gotas lipídicas emulsificadas dentro de una fase continua en la cual se encuentran presentes partículas proteicas dispersas. Ambas fases pueden ser modificadas por el procesamiento. Cruz *et al.* (2007) analizaron la distribución del tamaño de agregados en leches de soja tratadas con homogeneización por ultra-alta presión o con tratamiento térmico a ultra-alta temperatura (142 °C – 2 s). Los autores encontraron una reducción en el tamaño de partícula luego de la homogeneización a 200 o 300 MPa, lo cual no fue observado luego del tratamiento con ultra-alta temperatura. Sin embargo, Malaki Nik *et al.* (2009) reportaron una reducción en los tamaños de partículas presentes en leches de soja tratadas térmicamente (95 °C – 100 °C). Los autores asociaron esta disminución de tamaño a la ruptura de cuerpos proteicos de mayor tamaño. Estas discrepancias podrían deberse a diferencias en la distribución del tamaño de partícula, contenido proteico y composición polipeptídica presente en las leches crudas. Ono *et al.* (1991) propusieron que el calentamiento de leches de soja promueve la degradación de partículas grandes (diámetro > 100 nm) a proteínas solubles, las cuales se agregan para formar partículas de tamaño medio (40 nm < diámetro < 100 nm). De esta

manera, la distribución de agregados, producto de la formación o ruptura de especies existentes, puede ser diferente en cada trabajo realizado. Más aun, la contribución individual de la fase lipídica y los agregados proteicos a la distribución de tamaño no es fácilmente distinguible (Cruz *et al.* 2007). Por consiguiente, un parámetro como la viscosidad, la cual se encuentra influenciada tanto por las gotas lipídicas como por la distribución de tamaño de los agregados, podría ser un buen indicador del comportamiento del sistema completo.

### 3.2.5.3. Análisis de estabilidad física

Se determinó la estabilidad física en algunas muestras que formaron parte del diseño de Red de Doehlert y en otras muestras que, si bien no formaron parte del diseño experimental, en las mismas se observaron importantes efectos de diferentes tratamientos sobre los valores de %IFA y de SP. A través de las condiciones elegidas se buscó distinguir el efecto individual provocado por los tratamientos térmicos o con APH de los combinados. Por lo tanto, la temperatura utilizada en el tratamiento térmico a presión atmosférica (0,1 MPa) fue igual a la temperatura de proceso alcanzada en el tratamiento combinado con APH y temperatura. La concentración de  $\text{CaCl}_2$  correspondiente a 10 mmol.  $\text{L}^{-1}$  fue elegida debido al importante incremento observado en la solubilidad proteica luego del tratamiento, mientras que la concentración de  $\text{CaCl}_2$  de 15 mmol. $\text{L}^{-1}$  fue elegida por ser la mayor concentración evaluada en el diseño.

La desestabilización de las leches de soja, en las muestras en las cuales ocurrió, fue evidenciada por una separación de fases asociada únicamente a la sedimentación de agregados, sin observarse cremado en ninguna de las muestras inestables (Figura III.7.).



Figura III.7. Separación de fases en leches de soja sometidas a diferentes tratamientos luego de 0, 1 y 5 días de almacenamiento a 4 °C. En cada muestra se informa la concentración de  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{mmol.L}^{-1}$ ), la temperatura (tratamiento térmico a 0,1 MPa o temperatura de proceso de los tratamientos combinados, °C) y el nivel de presión (MPa), respectivamente. Ta: temperatura ambiente.

No se evidenció separación de fases en ninguna de las muestras a tiempo 0 ( $ratio = 0$ ). Luego de 1 y 5 días en algunas muestras se evidenció un sobrenadante con un límite definido. Los sobrenadantes presentaron diferente turbidez dependiendo de la composición del medio y del tratamiento aplicado. Este hecho revela la existencia de diversos agregados y partículas en las muestras de leche de soja, cada una con diferentes estabilidades coloidales. Las leches control (sin adición de calcio y sin ningún tipo de tratamiento) fueron estables a lo largo de los 5 días que duró el ensayo. La adición de 10  $\text{mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  produjo la desestabilización del sistema: se registraron *ratios* iguales a 0,095 y 0,405 luego de 1 y 5 días, respectivamente (Tabla III.7.). El sobrenadante de las muestras adicionadas con 10  $\text{mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  fue turbio probablemente debido a la existencia de gotas lipídicas dispersas y/o agregados insolubles que no precipitaron. La adición de 15  $\text{mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  también provocó la desestabilización del sistema, con un efecto más marcado que el observado en las muestras con menor contenido de calcio. Las *ratios* fueron mayores y los sobrenadantes traslúcidos (Tabla III.7.).

Tabla III.7. Estabilidad física de leches de soja sometidas a diferentes tratamientos luego de 0, 1 y 5 días de almacenamiento a 4 °C. La *ratio* fue definida como el cociente entre la longitud del sobrenadante y la longitud total de la muestra. Los nombres de las muestras corresponden a la concentración de CaCl<sub>2</sub> (mmol.L<sup>-1</sup>), temperatura del tratamiento térmico a 0,1 MPa o temperatura de proceso de los tratamientos combinados (°C) y el nivel de presión (MPa). Ta: temperatura ambiente. Transparencia del sobrenadante: sin separación (-), turbio (+), traslúcido (++) o transparente (+++).

Muestras	0 días		1 día		5 días	
	Ratio	Transparencia del sobrenadante	Ratio	Transparencia del sobrenadante	Ratio	Transparencia del sobrenadante
Control	0	-	0	-	0	-
10 Ta 0,1	0	-	0,095	+	0,405	+
10 85,0 0,1	0	-	0,152	+	0,256	+
10 95,0 0,1	0	-	0,142	+	0,210	+
10 79,7 500	0	-	0	-	0	-
10 94,7 600	0	-	0	-	0	-
15 Ta 0,1	0	-	0,212	++	0,512	++
15 80,0 0,1	0	-	0,369	+++	0,489	+++
15 90,0 0,1	0	-	0,214	+++	0,214	+++
15 77,4 650	0	-	0,582	+	0,633	++
15 83,7 550	0	-	0,320	++	0,433	++

El tratamiento térmico de las leches adicionadas con calcio en ambas concentraciones modificó el comportamiento de la muestra acelerando la separación de fases luego de 1 día, pero alcanzando una *ratio* menor luego de 5 días (Tabla III.7.). En el caso de la leche adicionada con 15 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> el tratamiento térmico condujo a la obtención de un sobrenadante más transparente en relación a la muestra con menor contenido de calcio probablemente debido a un aumento en la sedimentación inducida por la temperatura (Figura III.7.). Estos resultados están en concordancia con varios estudios previos sobre los cambios que producen los tratamientos térmicos sobre la estabilidad coloidal de las proteínas de soja (Kwok & Niranjana, 1995; Kwok, Liang & Niranjana, 2002; Malaki Nik *et al.* 2009). La combinación de APH y temperatura sobre leches de soja adicionadas con 10 mmol.L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> condujo a muestras estables (*ratio* = 0 durante los 5 días que duró el ensayo). Cuando la adición de calcio fue de 15 mmol.L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> se observaron separaciones de fases con sobrenadantes y *ratios* dependientes del nivel de presión aplicado y de la temperatura de proceso alcanzada (Figura III.7. y Tabla III.7.). De esta manera, los resultados obtenidos indicarían que la combinación de APH y temperatura mejorarían la estabilidad física de las leches de soja adicionadas con CaCl<sub>2</sub>, siendo el efecto final dependiente de su concentración y de las condiciones de proceso.

Poliseli-Scopel *et al.* (2012) encontraron que el tratamiento de leches de soja mediante homogeneización por ultra-alta presión (200 MPa – 300 MPa, temperatura de ingreso 55 °C - 75 °C) produjo dispersiones estables sin separación de fases evidente, mientras que los tratamientos con ultra-alta temperatura (142 °C – 6 s) o de pasteurización (95 °C – 30 s) generan sistemas en los cuales se observa a simple vista la formación de un sedimento en el fondo del recipiente que las contiene. Bernat *et al.* (2015) informaron que bajo determinadas condiciones de procesamiento se vio favorecida la estabilidad física de ciertos sistemas coloidales. Los autores encontraron que la homogenización a alta presión (172 MPa) seguido de un tratamiento térmico (85 °C – 30 min) aumentó la estabilidad de leches de almendra o avellana, debido probablemente a la solubilización de las proteínas y la consecuente formación de una matriz proteica continua (formación de un gel débil).

### 3.3. Conclusiones del Capítulo III

A partir de los resultados presentados en este capítulo se observó que, dentro de los rangos estudiados, la concentración de  $\text{CaCl}_2$  fue un factor significativo para la solubilidad proteica (SP), mientras que la temperatura inicial y el nivel de presión fueron factores significativos para la inactivación de los factores antinutricionales (%IFA). Varias de las condiciones ensayadas podrían ser aplicadas en la obtención de leches de soja con aumento en la SP e inactivación completa de la enzima lipoxigenasa (LOX) y de los factores antinutricionales. Las condiciones óptimas de procesamiento que maximizaron la SP y %IFA, determinadas a través de una metodología de superficie de respuesta y de la función deseabilidad, fueron: concentración de  $\text{CaCl}_2 = 8,53 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; temperatura inicial =  $55,8 \text{ }^\circ\text{C}$  y nivel de presión =  $614 \text{ MPa}$ .

El tratamiento combinado APH y temperatura aumentó la estabilidad física de las leches de soja: no se observó separación de fases luego de 5 días en las muestras adicionadas con  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$ . Este efecto podría ser consecuencia de múltiples factores: el aumento en la SP, la composición y el tamaño de los agregados proteicos, y/o la estructura del film interfacial de las gotas lipídicas.

Pudieron demostrarse los efectos solubilizante y estabilizante de las APH, en un alimento real y complejo como es la leche de soja adicionada con calcio, incluso a altas temperaturas. Por todo lo expuesto podríamos afirmar que la combinación de APH y temperatura nos permitiría obtener leches de soja adicionadas con calcio con mejoras en sus propiedades físicas, nutricionales y sensoriales sin la necesidad de incorporar aditivos.

### 3.4. Anexo Capítulo III

Tabla Anexo.III.1. Análisis de varianza (ANOVA) correspondiente a la variable respuesta solubilidad proteica (SP).

Factor	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio del error	F	p
Calcio (Ca)	196,0200	1	196,0200	99,84041	0,009868
Ca <sup>2</sup>	105,0256	1	105,0256	53,49354	0,018185
Presión (P)	9,3025	1	9,3025	4,73812	0,161441
P <sup>2</sup>	19,3603	1	19,3603	9,86095	0,088200
Temperatura (T)	2,8900	1	2,8900	1,47199	0,348877
T <sup>2</sup>	15,6963	1	15,6963	7,99474	0,105632
Ca x P	1,1250	1	1,1250	0,57301	0,528090
Ca x T	20,4800	1	20,4800	10,43124	0,083968
P x T	0,3200	1	0,3200	0,16299	0,725495
Falta de ajuste	5,3875	3	1,7958	0,91469	0,560089
Error puro	3,9267	2	1,9633	99,84041	0,009868
Suma de Cuadrados totales	360,1973	14			

En rojo se destacan los factores que resultaron significativos.

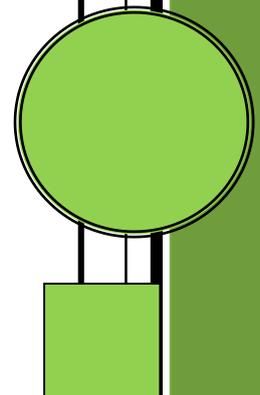
Tabla Anexo.III.2. Análisis de varianza (ANOVA) correspondiente a la variable porcentaje de inactivación de los factores antinutricionales (%IFA).

Factor	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio del error	F	p
Calcio (Ca)	32,000	1	32,000	5,1275	0,151827
Ca <sup>2</sup>	1,963	1	1,963	0,3146	0,631345
Presión (P)	760,381	1	760,381	121,8396	0,008108
P <sup>2</sup>	184,760	1	184,760	29,6050	0,032158
Temperatura (T)	1532,722	1	1532,722	245,5958	0,004047
T <sup>2</sup>	651,934	1	651,934	104,4627	0,009437
Ca x P	17,405	1	17,405	2,7889	0,236870
Ca x T	37,411	1	37,411	5,9946	0,134072
P x T	363,151	1	363,151	58,1895	0,016755
Falta de ajuste	23,847	3	7,949	1,2737	0,468167
Error puro	12,482	2	6,241		
Suma de Cuadrados totales	3446,044	14			

En rojo se destacan los factores que resultaron significativos.

## Capítulo IV

Bebida sin alcohol formulada con  
jugo de durazno y aislado de  
proteínas de soja y adicionada  
con calcio



## 4.1. Materiales y métodos

### 4.1.1. Obtención del jugo de durazno

Como materia prima para la obtención del jugo se utilizaron duraznos (*Prunus persica* (L.) Batsch) cv. *Summer Sweet*, calidad “elegido”, provenientes del alto valle de Río Negro (Moño Azul S.A., Río Negro, Argentina). Los mismos fueron lavados exteriormente con agua potable y trozados en cuartos, retirando las partes oscuras y el carozo. Posteriormente fueron procesados con un extractor de jugo Yelmo modelo JG 1700 (Yelmo, Argentina). El jugo obtenido fue rápidamente colocado en bolsas de plástico multilaminado (Cryovac BB2800, Sealed Air, Buenos Aires, Argentina), que fueron termoselladas. Posteriormente cada bolsa fue colocada dentro de otra bolsa de similares características que se envasó al vacío en envasadora Rapivac Minimax 850 (Servivac SRL, Buenos Aires, Argentina). Las muestras fueron almacenadas a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un *ultrafreezer* (Righi, Buenos Aires, Argentina), hasta su posterior uso. Previamente a su almacenamiento, se determinó el pH del jugo (valor promedio:  $4,35 \pm 0,02$ ) y el contenido de sólidos disueltos (graduación Brix, valor promedio:  $10,4 \pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{Bx}$ ) ambos a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Según esta escala  $1\text{ }^{\circ}\text{Bx}$  correspondería al índice de refracción de una solución de sacarosa  $1\text{ }\% \text{p/v}$ . Para tal fin se utilizó un refractómetro de mano modelo Master T (Atago, Tokio, Japón).

### 4.1.2. Formulación de la bebida

Previamente a la selección de la fórmula definitiva de la bebida se ensayaron distintas mezclas, utilizando como punto de partida formulaciones de productos con características similares existentes en el mercado. Las mismas consistieron en diferentes proporciones de jugo de durazno sin filtrar o filtrado mediante doble tela suiza, dispersiones de APS de distinta concentración, solución de sacarosa y cantidades variables de  $\text{CaCl}_2$  adicionado. A su vez, una parte de las mismas fue tratada con APH ( $600\text{ MPa} \cdot 5\text{ min} \cdot 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Parámetros como estabilidad física, fluidez y sabor fueron evaluados cualitativamente.

A partir de los resultados preliminares obtenidos con estas mezclas, se seleccionó una formulación que consistió en  $25\text{ g}$  de proteína de APS. $\text{L}^{-1}$ ,  $200\text{ g.L}^{-1}$  de jugo de durazno filtrado y  $64,2\text{ g.L}^{-1}$  de sacarosa (Cicarelli, Santa Fe, Argentina) adicionada con concentraciones de  $10$  y  $20\text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$ . Esta formulación mostró la mejor estabilidad física y fluidez en los ensayos preliminares.

#### 4.1.3. Obtención de la bebida

Para obtener 1 L de bebida se mezclaron 200 mL jugo de durazno filtrado a través de doble tela suiza, 500 mL de dispersión de APS 50 g de proteína.L<sup>-1</sup> y 300 mL de solución de sacarosa 214 g.L<sup>-1</sup>, de manera de obtener la formula mencionada en la sección 4.1.2. Posteriormente se agregó calcio en concentraciones de 10 y 20 mmol.L<sup>-1</sup> a partir de una solución madre 1,0 mol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> (Sigma, St. Louis, EEUU). Luego del agregado de CaCl<sub>2</sub>, el pH del jugo fue ajustado a 6,0 mediante el agregado de solución de NaOH 2,0 mol.L<sup>-1</sup>. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en dispersiones acuosas de APS a 10 g de proteína.L<sup>-1</sup>, que mostraban que el pH condicionaba el efecto solubilizante y estabilizante de los tratamientos con APH, se decidió aumentar el pH por arriba del valor del pH del jugo de durazno, pero sin llegar a valores que pudieran afectar negativamente las características sensoriales.

#### 4.1.4. Preparación y tratamiento de las muestras

Las bebidas fueron envasadas en botellas de polipropileno de 110 mL, las cuales una vez llenadas y tapadas fueron envasadas al vacío en bolsas plásticas de material multilaminado (Cryovac BB2800, Sealed Air, Buenos Aires, Argentina). Posteriormente las botellas fueron colocadas en el canasto de aluminio y este fue introducido en el cilindro del equipo de APH marca Stansted Fluid Power Ltd. modelo Iso-Lab System, FPG 9400:922 (Stansted, Reino Unido) descrito en la Introducción y en el Capítulo I de este trabajo. El fluido de compresión utilizado consistió en una mezcla de propilenglicol:agua en una relación 30:70 (v/v). Los tratamientos fueron realizados a  $600 \pm 5$  MPa durante 5 min a una temperatura inicial de 20 °C, alcanzándose una temperatura máxima de 33,5 °C debido al calentamiento por compresión. La velocidad de compresión fue de 5 MPa.s<sup>-1</sup> y la de despresurización de 20 MPa.s<sup>-1</sup>.

#### 4.1.5. Determinación de solubilidad proteica

La concentración de proteína soluble (g.L<sup>-1</sup>) fue determinada por el método del ácido bicinonínico (BCA) (Smith et al., 1985), utilizando un kit comercial (Sigma, St. Louis, EEUU) de la misma forma descrita en la sección 1.1.6.3. Los resultados se expresaron como el contenido de proteína soluble (g.L<sup>-1</sup>) o en función del incremento relativo de la concentración de proteína soluble (IS%),

$$IS\% = (S_{\text{APH}} - S_0) \times 100 / S_0$$

siendo  $S_0$  la concentración de proteína soluble antes del tratamiento con APH y  $S_{\text{APH}}$  la concentración de proteína soluble después del tratamiento con APH. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

#### 4.1.6. Análisis de estabilidad física

Las muestras fueron analizadas utilizando un analizador óptico vertical de barrido modelo QuickScan (Beckman-Coulter inc., Miami, EEUU) de la misma forma descrita en la sección 1.1.9.1. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

#### 4.1.7. Determinación de la viscosidad aparente

Se midió la viscosidad aparente a 20 °C usando un reómetro HAAKE RheoStress 6000 (Thermo Electron Corporation, Alemania) equipado con rotor cilíndrico Z34 DIN (34 mm de diámetro) de la misma manera descrita en la sección 3.1.7.1. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

#### 4.1.8. Determinación de los parámetros cromáticos

Los parámetros cromáticos de las bebidas fueron determinados mediante el sistema CIE  $L^*a^*b^*$  usando un colorímetro Minolta CR-400 (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japón) antes y después del tratamiento con APH. Para ello se colocaron 20 mL de muestra en una cubeta de cuarzo y se realizaron 3 mediciones a partir de las cuales se determinaron los parámetros:  $L^*$  (luminosidad, con una escala que va del 0-negro al 100-blanco),  $a^*$  (posición en la escala que va del verde (-) al rojo (+)) y  $b^*$  (posición en la escala que va del azul (-) al amarillo (+)) (Figura IV.1.). Estos tres valores pueden transformarse mediante fórmulas matemáticas a otro sistema de color denominado  $L^*C^*h^\circ$  (Figura IV.1.) donde  $C^*$  representa el croma o saturación, para el cual un valor 0 representa colores grisáceos, apagados o sin pigmentar, y 60 representa colores vívidos y saturados y  $h^\circ$  representa el ángulo del tono, donde un ángulo de 0° ó 360° representa el color rojo, 90° el amarillo, 180° el verde y 270° el azul. Este sistema es fácil de interpretar porque refiere de manera directa a nuestra percepción visual de las características cromáticas (Korkut, 2012) En todos los casos se utilizó iluminación D65, la cual se aproxima a la luz del día (Saláková *et al.* 2009) y un ángulo de visión de 2° y se

calibró utilizando un placa de cerámica estándar blanca. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

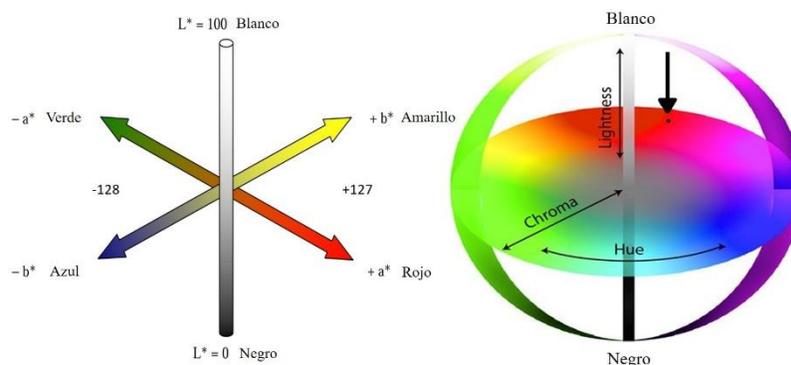


Figura IV.1. Representación de los espacios de color CIE  $L^*a^*b^*$  y CIE  $L^*C^*h^\circ$ . *Lightness* representa la luminosidad, *Chroma* la saturación y *Hue* el ángulo del tono.

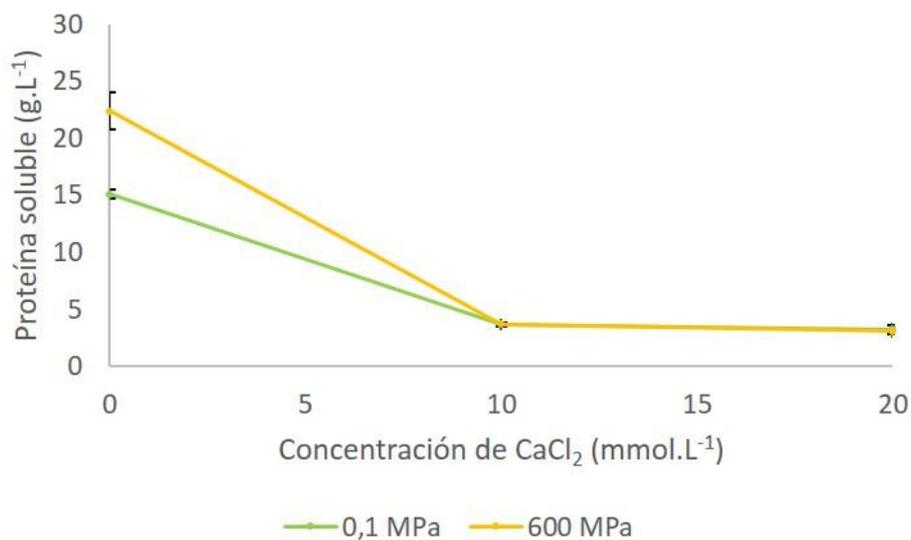
#### 4.1.9. Análisis estadístico

Los datos correspondientes a la determinación de solubilidad proteica, viscosidad aparente y parámetros cromáticos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA). Se analizaron las diferencias entre medias de cada muestra mediante el test de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) mediante el software Origin 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EEUU).

## 4.2. Resultados y discusión

### 4.2.1. Determinación de solubilidad proteica

La solubilidad proteica en las bebidas en función de la concentración de calcio y sin (0,1 MPa) o con tratamiento con APH (600 MPa-5 min-20 °C) se presenta en la Figura IV.2.



**Figura IV.2.** Solubilidad proteica en bebidas formuladas con jugo de durazno y dispersiones de APS adicionados con CaCl<sub>2</sub>, sin (0,1 MPa) o con tratamiento con APH (600 MPa-5 min-20 °C). Los valores se expresaron como la media ± desvío estándar.

La adición de CaCl<sub>2</sub> produjo la disminución de la solubilidad proteica, siendo la magnitud de la insolubilización equivalente para las dos concentraciones ensayadas. En el caso de las bebidas no tratadas con APH (0,1 MPa) la incorporación de CaCl<sub>2</sub>, en ambas concentraciones, produjo una reducción de la solubilidad proteica del 24,5 %. Este resultado concuerda con los descritos en los capítulos previos, en los cuales la adición de calcio a dispersiones de APS en agua bidestilada (Capítulo I) o *buffers* (Capítulo II) y a leches de soja (Capítulo III) produjo la insolubilización de las proteínas.

El tratamiento con APH aumentó la solubilidad proteica en las muestras sin adición de CaCl<sub>2</sub>, produciéndose un incremento relativo de la misma del 48 %. No obstante, no se observó efecto del tratamiento con APH en las muestras adicionadas con CaCl<sub>2</sub>. A diferencia de lo descrito en los capítulos anteriores, en las bebidas no se observó el efecto solubilizante del tratamiento con APH. Este resultado pudo deberse a dos fenómenos, por un lado, algún componente de la bebida podría interferir con el efecto solubilizante; por otro lado, la relación calcio/proteína en estas bebidas podría corresponder a valores en que el efecto ya no se verifique. Entre los componentes de la bebida, la alta concentración de

sacarosa podría ejercer un efecto osmótico limitando la cantidad de agua disponible para interactuar con las proteínas, promoviendo las interacciones proteína-proteína. Otros componentes del durazno como fibra, proteínas, cobre y zinc (Matei *et al.* 2013) también podrían interactuar con las proteínas de soja y/o con el calcio modificando la solubilidad proteica. Las relaciones calcio/proteína (0,4 y 0,8 mmol/g) y el pH (6,0) sitúan a estas bebidas en una condición similar a la que en el Capítulo I tuvieron las muestras a pH 5,9, 10 g.L<sup>-1</sup> y 5 mmol.L<sup>-1</sup> (con una relación de 0,5 mmol/g) en que tampoco se observó el efecto solubilizante.

#### 4.2.2. Análisis de estabilidad física

La estabilidad de una suspensión es un factor muy importante para el control de ciertos procesos, siendo un parámetro que influye en forma marcada sobre la calidad final del producto. La estabilidad es afectada por varios factores como el contenido total de sólidos, la distribución de tamaños, la carga y la forma de las partículas. (Silva *et al.* 2010).

En la Figura IV.3. se muestra la cinética de %T a 850 nm a 25, 30, 40 y 50 mm de altura tomados desde la base de la celda de vidrio para la bebida sin adición de calcio, sin (0,1 MPa) o con tratamiento con APH (600 MPa-5 min -20 °C).

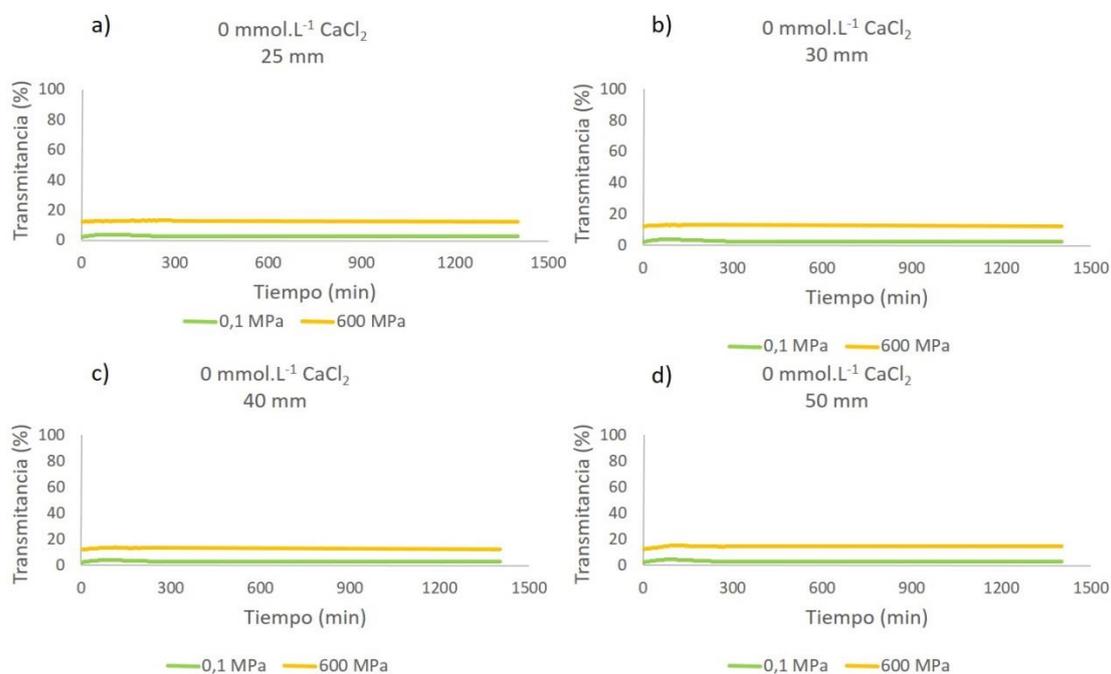
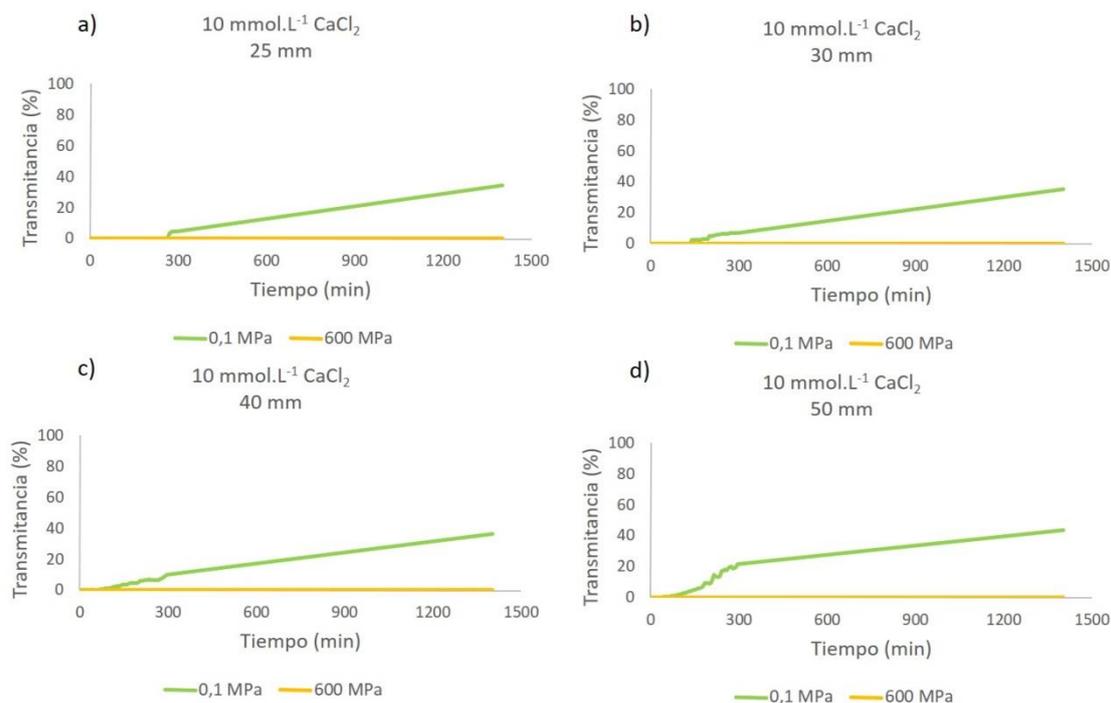


Figura IV.3. Cinética de porcentaje de luz transmitida (%T) a 850 nm para la bebida sin adición de calcio, sin (0,1 MPa) o con tratamiento con APH (600 MPa-5 min -20°C). Las longitudes corresponden a valores comprendidos entre la parte media de la celda de vidrio (25 mm, panel a)) y la parte superior de la misma (50 mm, panel d)).

En las muestras sin tratamiento con APH (0,1 MPa) los valores de %T se mantuvieron constantes y cercanos a 0 % en todas las zonas del tubo analizadas, lo que indica que los jugos resultaron turbios y estables (Figura IV.3., paneles a)-d)). El tratamiento con APH no produjo cambios en la estabilidad de las muestras. En todas las zonas analizadas el %T se mantuvo constante, pero a un valor ligeramente superior (valor cercano al 13 %) en relación a las muestras sin tratamiento con APH (Figura IV.3., paneles a)-d)). Esta disminución de la turbidez de las bebidas tratadas con APH podría estar asociada al aumento en la solubilidad proteica registrado en estas muestras (Figura IV.2.). La opacidad de estos sistemas se ha asociado con la presencia de partículas insolubles dispersas, formadas por pectinas, proteínas, lípidos, celulosa, hemicelulosa y otros componentes minoritarios (Yamasaki, Yasui & Arima, 1964; Scott *et al.* 1965; Benítez, Genovese & Lozano, 2007). Adicionalmente, la menor turbidez determinada en las muestras tratadas con APH, podría estar asociada a una disminución en el tamaño de partícula generada por la aplicación de alta presión, como pudo observarse en las dispersiones de APS en *buffers* (Capítulo II). Okoth, Kaahwa e Imungi (2000) trabajaron con jugo de *Passiflora edulis* tratado mediante homogeneización por presión y observaron una disminución de la opacidad del jugo al incrementar el nivel de presión, lo cual fue atribuido por los autores a la reducción del tamaño de partícula, permitiendo que mayor cantidad de luz pueda atravesar la muestra.

Las bebidas adicionadas con 10 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> sin tratamiento con APH (0,1 MPa) mostraron aumentos en el %T debido a la separación de fases luego de aproximadamente 115 minutos en la parte superior del tubo (40 - 50 mm), extendiéndose hasta la parte media del tubo (25 mm) luego de casi 5 h de análisis (Figura IV.4.). Estos cambios en el %T podrían deberse a la sedimentación de agregados insolubles, proceso que se mantuvo durante las 24 h que duró el ensayo, alcanzando el %T un valor final entre 34 % (25 mm) y 43 % (50 mm) (Figura IV.4., paneles a) y d)). Esto indicaría que parte de los agregados formados permanecieron en suspensión en la bebida al final del ensayo.

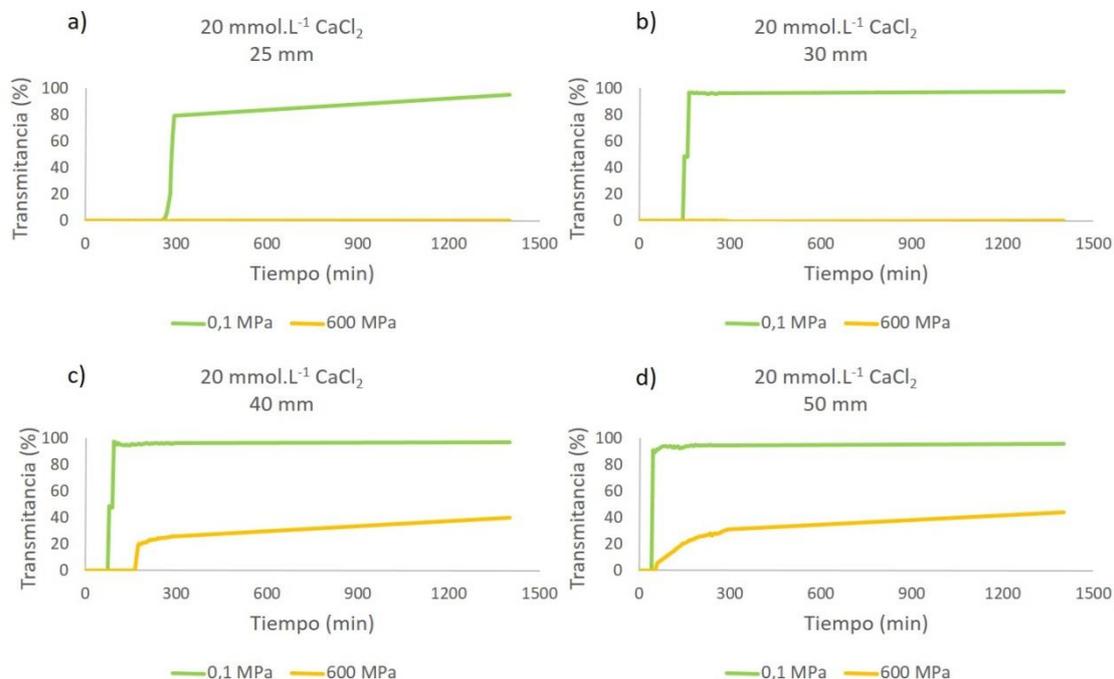


**Figura IV.4.** Cinética de porcentaje de luz transmitida (%T) a 850 nm para la bebida adicionada con 10 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>, sin (0,1 MPa) o con tratamiento con APH (600 MPa-5 min -20°C). Las longitudes corresponden a valores comprendidos entre la parte media de la celda de vidrio (25 mm, panel a)) y la parte superior de la misma (50 mm, panel d)).

Las bebidas adicionadas con 10 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> y tratadas con APH no presentaron cambios en el %T en ninguna de las zonas del tubo analizadas (Figura IV.4., paneles a-d)). Los valores de %T constantes y cercanos a 0 % a lo largo del tubo estudiado indican que la aplicación de APH produjo bebidas turbias y estables al menos por 24 h, a diferencia de las bebidas adicionadas con la misma concentración de calcio, pero sin tratamiento con APH, las que también resultaron turbias, pero inestables.

El incremento de la concentración de calcio en las bebidas (20 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>) aumentó la inestabilidad en las muestras sin tratamiento con APH en relación a aquellas con 10 mmol.L<sup>-1</sup> de calcio. Como puede observarse en la Figura IV.5. las bebidas resultaron altamente inestables, observándose en todas las zonas del tubo analizadas un rápido aumento en el %T. En la parte superior del tubo, 40 o 50 mm, se registró un incremento en el %T luego de 100 y 50 min respectivamente, alcanzando un valor constante cercano a 95 % (Figura IV.5., paneles c) y d)). En la parte media del tubo (25 mm) la desestabilización pudo evidenciarse, al igual que en las muestras con 10 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> adicionado, cerca de las 5 h de comenzado del ensayo (Figura IV.5., panel a)). No obstante, la velocidad de aumento del %T y el valor final alcanzado (95 %) fueron mayores. A diferencia de lo que

ocurrió en las bebidas con menor concentración de calcio, los valores de %T cercanos al 95 % indicarían que prácticamente la totalidad de los agregados precipitaron luego de 24 h.



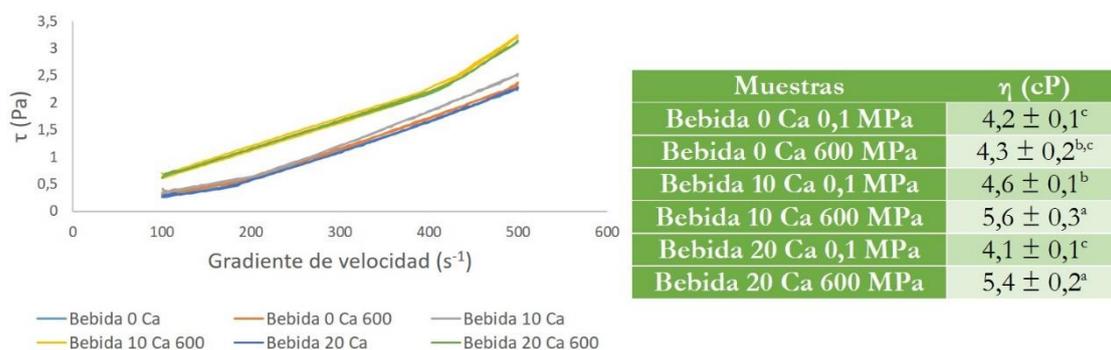
**Figura IV.5.** Cinética de porcentaje de luz transmitida (%T) a 850 nm para la bebida adicionada con 20 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>, sin (0,1 MPa) o con tratamiento con APH (600 MPa-5 min -20°C). Las longitudes corresponden a valores comprendidos entre la parte media de la celda de vidrio (25 mm, panel a)) y la parte superior de la misma (50 mm, panel d)).

El tratamiento con APH de las bebidas adicionadas con 20 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> mejoró la estabilidad de las mismas. El aumento en el %T, asociado a procesos de sedimentación de agregados, se registró al menos hasta los 40 mm del tubo, con una menor pendiente y alcanzando un valor final menor que las muestras sin tratamiento (42 *vs.* 95 %) (Figura IV.5., panel c)). Esto sugiere que el tratamiento con APH provocaría que parte de los agregados que sedimentaron en las muestras sin tratamiento permanezcan en suspensión. A su vez, no se registraron cambios en el %T en las zonas del tubo correspondientes a los 25 y 30 mm (Figura IV.5., paneles a) y b)). Vale la pena destacar que si bien las bebidas adicionadas con 20 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> y tratadas con APH presentaron separación de fases, la misma fue de menor magnitud en relación a las muestras sin tratamiento. La comparación con la bebida adicionada con 10 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> y tratada con APH, en la que la estabilización fue más importante, indica que la concentración de calcio (y/o la relación calcio/proteína) fue una variable crítica también en este sistema.

Estos resultados concuerdan con los encontrados en dispersiones de APS en agua bidestilada (Capítulo I) y en leches de soja (Capítulo III). En esos sistemas adicionados con  $\text{CaCl}_2$ , la aplicación del tratamiento con APH mejoró la estabilidad física de los mismos. De la misma forma que en esos sistemas, en las bebidas estudiadas en el presente capítulo, se puso de manifiesto que la aplicación de APH aumentó la estabilidad coloidal aunque no incrementó la solubilidad proteica, lo que indicaría independencia de ambos fenómenos. A su vez, la estabilidad coloidal estaría asociada a una disminución en el tamaño de partícula y/o a un aumento en la viscosidad aparente del sistema.

#### 4.2.3. Determinación de la viscosidad aparente

En la Figura IV.6. se muestran las curvas de flujo y el valor de  $\eta$  evaluada a  $400 \text{ s}^{-1}$  para las diferentes bebidas estudiadas. Todas las muestras presentaron un patrón común: en todos los casos se observó un punto de inflexión en las curvas de esfuerzo de corte ( $\tau$ ) en función de la velocidad de deformación. Para las muestras Bebida 0 Ca 0,1 MPa, Bebida 0 Ca 600 MPa, Bebida 10 Ca 0,1 MPa y Bebida 20 Ca 0,1 MPa la variación del esfuerzo de corte en función de la velocidad de deformación aumentó su pendiente a partir de los  $200 \text{ s}^{-1}$ , mientras que para las muestras Bebida 10 Ca 600 MPa y Bebida 20 Ca 600 MPa el cambio de pendiente se registró a una velocidad de deformación de  $400 \text{ s}^{-1}$ . En todo el rango de velocidad de deformación ensayado, el esfuerzo de corte de las bebidas adicionadas con calcio (10 o 20  $\text{mmol.L}^{-1}$ ) y tratadas con APH resultó mayor que el correspondiente a las muestras restantes.



**Figura IV.6.** Esfuerzo de corte ( $\tau$ ) vs. gradiente de velocidad para las diferentes muestras de bebida y valor de viscosidad evaluada a una velocidad de deformación de  $400 \text{ s}^{-1}$ . En el nombre de las muestras los números simbolizan la concentración de calcio adicionado (10  $\text{mmol.L}^{-1}$  o 20  $\text{mmol.L}^{-1}$ ) y el nivel de presión utilizado (600 MPa). En la tabla los valores se expresaron como la media  $\pm$  desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

A partir de los valores de  $\eta$  obtenidos a una velocidad de deformación de  $400 \text{ s}^{-1}$  (Figura IV.6.) se observó que la adición de calcio ( $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) produjo un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) en la  $\eta$  de las muestras sin tratamiento con APH, probablemente debido a la formación de agregados solubles e insolubles. Este mismo efecto fue observado cuando el calcio fue agregado a leches de soja sin tratamiento (Capítulo III). No obstante, un mayor aumento en la concentración de calcio adicionado ( $20 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) a las muestras sin tratamiento no produjo ese efecto sobre la viscosidad. Probablemente la combinación de estructura, tamaño y carga superficial de los agregados formados a la mayor concentración de calcio resultó en una menor interacción con el agua u otros componentes de la fase continua del sistema, dando un balance que no modificó la viscosidad.

El tratamiento con APH de las bebidas sin adición de calcio no produjo cambios en la viscosidad de las muestras, mientras que las bebidas adicionadas con calcio presentaron los valores más altos de viscosidad. En las bebidas adicionadas con calcio y tratadas con APH podrían haberse establecido interacciones entre las proteínas de soja, las pectinas presentes en el jugo de durazno y el calcio, induciendo un estado tipo sol que sería el responsable de los mayores valores de viscosidad, en relación al resto de las muestras, inicialmente registrados (Figura IV.6.). Los tratamientos con APH pueden aumentar la actividad de la enzima pectinmetilesterasa (PME) y reducir la de la poligalacturonasa (PG) (Oey *et al.* 2008). La PME cataliza la desesterificación de los grupos metilo de la pectina (los cuales forman uniones del tipo metil-éster con el ácido galacturónico) produciendo metanol, moléculas de pectina con un grado menor de metilación y ácido galacturónico. Por su parte, la PG hidroliza posteriormente las uniones glicosídicas de las sustancias pécticas desesterificadas. En este sentido, dado que las APH provocarían un aumento de la actividad PME y una reducción de la actividad PG, un tratamiento de este tipo propiciaría la formación de moléculas de pectina con menor grado de metilación por acción de la PME, las cuales no podrían ser posteriormente degradadas por la PG. Esto induciría un mayor grado de entrecruzamiento entre las cadenas de pectina de bajo metoxilo y los cationes divalentes tales como calcio, con la consecuente formación de una estructura tridimensional tipo gel (Oey *et al.* 2008). Este fenómeno pudo ser observado en algunas de las formulaciones preliminares, en las cuales el contenido de proteínas de APS y de jugo filtrado de durazno fueron mayores ( $35 \text{ g.L}^{-1}$  y  $300 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente) manteniendo las mismas concentraciones de calcio adicionado (datos no mostrados). Por su parte, Min, Jin y Zhang (2003) informaron que durante el procesamiento de jugo de tomate mediante campos eléctricos pulsantes de alta intensidad puede ocurrir la formación de complejos

reversibles entre pectinas y proteínas, los cuales contribuirían al incremento de la viscosidad. A su vez, el tratamiento con APH produciría un incremento en el contenido de pectina soluble a partir de la disrupción de la pared celular aumentando de esta manera la viscosidad de las muestras. En este sentido, la aplicación de APH puede modificar la permeabilidad de las células de frutas y hortalizas, permitiendo el movimiento de agua y metabolitos desde o hacia su interior (Oey *et al.* 2008). Hayes, Smith y Morris (1998) encontraron un incremento en la viscosidad de jugos de sandía tratados por campos eléctricos pulsantes de alta intensidad y lo relacionaron con la lixiviación de la pectina a partir de la estructura celular inducida por el tratamiento. Xu, Shoemaker y Luh (1986) trabajaron con pasta de tomate y relacionaron la mayor viscosidad en el producto con la presencia de una dispersión coloidal de pectina más concentrada.

El incremento en  $\eta$  producido por las APH podría ser una de las causas del aumento en la estabilidad física que mostraron estas muestras. Silva *et al.* (2010) informaron que muestras de pulpa de ananá con valores de viscosidad elevadas fueron capaces de mantener la estabilidad física del sistema por mayor tiempo.

#### 4.2.4. Determinación de los parámetros cromáticos

El tratamiento con APH (a baja o moderada temperatura) presenta un efecto limitado sobre los pigmentos (clorofila, carotenoides, antocianinas, entre otros) responsables del color de frutas y hortalizas. En los duraznos, el color rojo está generalmente asociado a un alto contenido de antocianinas, mientras que los colores amarillo-anaranjado están asociados al contenido de carotenoides (Oey *et al.* 2008). Garcia-Palazon *et al.* (2004) determinaron la actividad de polifenol oxidasa presente en frambuesa roja y frutilla luego de tratamientos con APH entre 400 y 800 MPa a 18 °C-22 °C durante 15 min y concluyeron que la resistencia de esta enzima a esos tratamientos sería responsable de los cambios en el color por degradación de antocianinas. Numerosos estudios demostraron la estabilidad de los carotenoides frente a la aplicación de APH (Qiu *et al.* 2006; Rodrigo, van Loey & Hendrickx, 2007). Debido a la estabilidad que muestran los pigmentos frente a las APH, los posibles cambios de color en los productos derivados de frutas y hortalizas podrían estar relacionados con cambios en actividades enzimáticas o en la estructura de otros componentes de los alimentos. Los parámetros cromáticos determinados en las bebidas correspondientes a los distintos tratamientos se muestran en la Tabla IV.1. A partir de los valores obtenidos se observó un aumento en el valor de  $L^*$  en la Bebida 0 Ca a 600

MPa en relación a la Bebida 0 Ca 0,1 MPa. A su vez, el tratamiento con APH produjo un aumento del parámetro  $h^\circ$  de la bebida, tornándose más verdosa.

La incorporación de calcio aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) la luminosidad ( $L^*$ ) y la intensidad del color (mayores valores de  $C^*$ ) de las bebidas con concentraciones de 10 y 20  $\text{mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  no tratadas con APH (0,1MPa), en relación a la Bebida 0 Ca 0,1 MPa. Cuando el calcio fue adicionado a las bebidas se produjo la insolubilización de las proteínas de soja. La coloración blanquecina – marfil de estos agregados podría ser la causa del aumento registrado en el parámetro  $L^*$ . A su vez, las bebidas con calcio resultaron menos opacas (mayor valor del parámetro  $C^*$ ) que las bebidas sin calcio. Adicionalmente, los valores de  $b^*$  aumentaron y los de  $h^\circ$  disminuyeron significativamente ( $p < 0,05$ ) para ambas concentraciones de calcio, por lo que el color de las bebidas se tornó más amarillo mientras que la Bebida 0 Ca 0,1 MPa presentó un color más cercano al verdoso.

El tratamiento con APH de las bebidas adicionadas con calcio (10 Ca 600 MPa y 20 Ca 600 MPa) produjo la disminución de  $L^*$  y de  $C^*$  en relación al mismo tipo de muestras sin tratamiento (0,1 MPa), tornando más oscuras y opacas las bebidas. La disminución del valor de  $L^*$  podría estar asociado a una reducción de la turbidez de las muestras como consecuencia de la formación de agregados de menor tamaño o distinta estructura por efecto del tratamiento con APH, sin que el contenido de proteína soluble se vea modificado. Este efecto fue observado en las dispersiones de APS 10 g de proteína. $\text{L}^{-1}$  a pH 5,9 adicionadas con 2,5  $\text{mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  con y sin tratamiento con APH (Capítulo II), en las cuales el tratamiento con APH produjo una disminución de la turbidez de las mismas sin observarse cambios en el contenido de proteína soluble. No obstante, en las bebidas 10 Ca 600 MPa y 20 Ca 600 MPa la luminosidad ( $L^*$ ) y la saturación ( $C^*$ ) fueron significativamente mayores y el ángulo del tono ( $h^\circ$ ) significativamente menor (tonalidad amarilla, valores próximos a  $90^\circ$ ) que los determinados en la Bebida 0 Ca 0,1 MPa.

**Tabla IV.1. Parámetros cromáticos determinados en las bebidas correspondientes a diferentes tratamientos**

Bebidas	L*	a*	b*	C*	h°
0 Ca 0,1 MPa	68,0 ± 0,9 <sup>e</sup>	-3,8 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,5 <sup>d</sup>	4,0 ± 0,2 <sup>e</sup>	164,8 ± 6,1 <sup>b</sup>
0 Ca 600 MPa	71,2 ± 3,6 <sup>d</sup>	-4,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	-0,2 ± 1,5 <sup>e</sup>	4,3 ± 0,1 <sup>e</sup>	182,5 ± 19,8 <sup>a</sup>
10 Ca 0,1 MPa	83,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	-1,1 ± 0,1 <sup>d</sup>	10,5 ± 0,3 <sup>b</sup>	10,6 ± 0,3 <sup>c</sup>	96,0 ± 0,6 <sup>c,d</sup>
10 Ca 600 MPa	77,1 ± 1,4 <sup>c</sup>	-1,8 ± 0,3 <sup>c</sup>	7,8 ± 1,2 <sup>c</sup>	8,0 ± 1,1 <sup>d</sup>	103,5 ± 3,5 <sup>c</sup>
20 Ca 0,1 MPa	83,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	-0,3 ± 0,1 <sup>e</sup>	12,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	12,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	91,2 ± 0,5 <sup>d</sup>
20 Ca 600 MPa	79,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	-0,5 ± 0,1 <sup>e</sup>	11,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	11,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	92,3 ± 0,4 <sup>c,d</sup>

Los datos se expresaron como la media ± el desvío estándar. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas (Tukey,  $p < 0,05$ ).

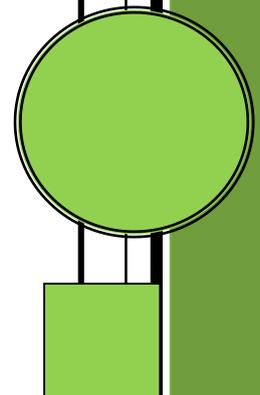
#### 4.3. Conclusiones del Capítulo IV

Los tratamientos con APH no aumentaron la solubilidad proteica en las bebidas adicionadas con calcio. Diferencias en la composición de la muestra (componentes de la bebida o relación pH/calcio/proteína) podrían ser la causa de la falta de efecto en relación a lo observado en dispersiones de APS en agua bidestilada (Capítulo I), en *buffer* (Capítulo II) o en leches de soja (Capítulo III). En un estudio futuro se debería analizar la causa de la ausencia del efecto solubilizante de las proteínas por parte del tratamiento con APH.

La aplicación de APH mejoró la estabilidad física de las bebidas adicionadas con calcio. Estos resultados, observados en un sistema diferente a los estudiados en los Capítulos I, II y III, reafirman la idea de la independencia relativa entre los efectos de los tratamientos con APH sobre la solubilidad proteica y la estabilidad coloidal de los sistemas.

La aplicación de tratamientos con APH permitiría mejorar las características funcionales (aumento de estabilidad física) y nutricionales (incorporación de proteínas y calcio) de bebidas sin alcohol. Resultaría necesaria la realización de un análisis sensorial para completar la caracterización de estas bebidas.

# Conclusiones generales



## Conclusiones generales

En este trabajo se estudiaron los efectos de los tratamientos con APH sobre distintas propiedades funcionales de proteínas de soja adicionadas con calcio en sistemas de diferente complejidad, a la vez que se analizaron los posibles mecanismos que explicarían los efectos observados.

Se analizaron los efectos solubilizantes y estabilizantes del tratamiento con APH sobre proteínas de soja adicionadas con minerales. El desensamblado de grandes agregados para generar otros más pequeños estuvo involucrado en el efecto solubilizante. Cambios en el pH, en la concentración de calcio y la presencia de *buffers* modificaron los efectos del tratamiento con APH, lo que sugiere que los mecanismos involucrados dependen fuertemente de factores electrostáticos. La combinación de pH, concentración proteica y de calcio y tratamiento con APH permitió generar dispersiones en las cuales fue posible establecer la solubilidad y la proporción de agregados insolubles físicamente estables, en función de los valores seleccionados de esos factores. Esto muestra el potencial de los tratamientos con APH como herramienta para modificar la funcionalidad de las proteínas de soja a la medida de distintos requerimientos.

Los efectos estabilizante y solubilizante fueron relativamente independientes. El efecto estabilizante se verificó en todos los sistemas estudiados (agua, *buffer*, leche de soja, bebida formulada con jugo de durazno y APS). Mientras que el efecto solubilizante no se verificó en la bebida preparada con jugo de durazno y APS. Los estudios sobre emulsiones sugirieron que la incorporación de calcio en combinación con el tratamiento con APH afectó negativamente la capacidad de formar y estabilizar emulsiones. Este fenómeno podría reflejar los cambios que aumentaron el carácter hidrofílico de estas proteínas, lo que habría afectado negativamente el balance hidrofóbico-hidrofílico. Las potenciales aplicaciones de las proteínas de soja adicionadas con calcio y modificadas por los tratamientos con APH deberían enfocarse en sistemas en que se requiera mejorar las propiedades funcionales, especialmente aquellas que dependan de una adecuada interacción proteína-agua, como solubilidad, gelificación y retención de agua.

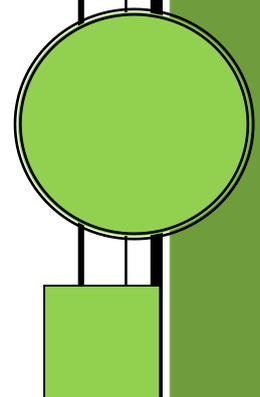
La combinación de tratamiento con APH y temperaturas iniciales entre 45 y 65 °C permitió obtener una leche de soja adicionada con calcio, con solubilidad proteica y estabilidad física

mejoradas y en la cual se logró la inactivación completa de la enzima lipoxigenasa y de los factores antinutricionales. Estos tratamientos permiten que el alimento se caliente rápidamente, debido a la generación interna de calor por la compresión, lo cual determina que el tiempo de proceso sea corto, con la consecuente reducción del gasto energético y la preservación de la calidad nutricional y sensorial del producto tratado.

Los resultados de los estudios correspondientes a bebidas no alcohólicas formuladas con jugo de durazno y APS y adicionadas con calcio mostraron que el tratamiento con APH permitió aumentar el valor nutricional al estabilizar físicamente un alimento con proteínas y calcio. Estudios futuros contribuirán a determinar si la ausencia del efecto solubilizante se debió a la influencia de algún componente de las bebidas y/o a las condiciones de pH y concentraciones proteica y de calcio utilizadas en la formulación.

Los resultados del presente trabajo indican que los tratamientos con APH sobre proteínas de soja adicionadas con minerales, particularmente calcio, produjeron modificaciones que podrían ser aprovechadas tecnológicamente para mejorar características de alimentos existentes (*i.e.* leche de soja) como para formular ingredientes o alimentos con propiedades funcionales que se adapten a requerimientos específicos de solubilidad o estabilidad coloidal.

# Referencias bibliográficas



**Referencias Bibliográficas**

- Adamson, A. W. (1976). Physical chemistry of surfaces. Tercera edición. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Adlercreutz, H. & Mazur, W. (1997). Phyto-estrogens and Western diseases. *Annals of Medicine*, 29: 95-120.
- Agboola, S. O. & Dalgleish, D. G. (1995). Calcium-induced destabilization of oil-in-water emulsions stabilized by caseinate or by  $\beta$ -Lactoglobulin. *Journal of Food Science*, 60 (2), 399–404
- Agboola, S. O. & Dalgleish, D. G. (1996). Kinetics of calcium-induced instability of oil-in-water emulsions: Studies under quiescent and shearing conditions. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 29, 425.
- Alvarez, P. A., Ramaswamy, H. S. & Ismail, A. A. (2008). High pressure gelation of soy proteins: Effect of concentration, pH and additives. *Journal of Food Engineering*, 88, 331-340.
- Anderson, J. W., Johnstone, B. M. & Cook-Newell, M. E. (1995). Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *The New England Journal of Medicine*, 333: 276-282.
- Añón, M. C., de Lamballerie, M. & Speroni, F. (2011). Influence of NaCl concentration and high pressure treatment on thermal denaturation of soybean proteins. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12 (4), 443–450.
- Añón, M. C., de Lamballerie, M. & Speroni, F. (2012). Effect of high pressure on solubility and aggregability of calcium-added soybean proteins. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 155–162.
- Appu Rao, A. G. & Narasinga Rao, M. S. (1976). Binding of Ca (II), Mg (II) and Zn (II) by 7S fraction of soybean proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24, 490-494.
- Araujo, P. W. & Brereton, R. G. (1996). Experimental design II. Optimization. *Trends in Analytical Chemistry*, 15 (2), 63–70.
- Axelrod, B., Cheesbrough, T. M. & Laakso, S. (1981). Lipoxygenase from soybeans. En *Methods in Enzymology*, 71, 441-451. Academic Press, Inc.

- Badley, R. A., Atkinson, D., Hauser, H., Oldani, D., Green, J. P. & Stubbs, J. M. (1975). The structure physical and chemical properties of the soybean protein glycinin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 469, 214-228.
- Balasubramaniam, V., Ting, E., Stewart, C. & Robbins, J. (2004). Recommended laboratory practices for conducting high-pressure microbial inactivation experiments. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(3), 299-306.
- Balny, C., & Masson, P. (1993). Effects of high pressure on proteins. *Food Review International*, 9, 611–628.
- Balny, C., Masson, P., & Heremans, K. (2002). *Frontiers in High Pressure Biochemistry and Biophysics*, Elsevier, Amsterdam.
- Banon, S. & Hardy, J. (1991). Study of acid milk coagulation by an optical method using light reflection. *Journal of Dairy Research*, 58 (1), 75-84.
- Baur, C., Grosch, W., Wieser, H. & Jugel, H. (1977). Enzymatic oxidation of linoleic acid: formation of bittertasting fatty acids. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. 164: 171-176.
- Benítez, E. I., Genovese, D. B. & Lozano, J. E. (2007). Scattering efficiency of a cloudy apple juice: effect of particles characteristics and serum composition. *Food Research International*, 40, 915-922.
- Benjamins, J., Cagna, A. & Lucassen-Reynders, E. H. (1996). Viscoelastic properties of triacylglycerol/water interfaces covered by proteins. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 114, 245–254.
- Berger, K.G. (1997). 9- Ice cream. En: *Food Emulsions*. Tercera edición. Marcel Dekker, New York.
- Bernat, N., Cháfer, M., Rodríguez-García, J., Chiralt, A. & González-Martínez, C. (2015). Effect of high pressure homogenisation and heat treatment on physical properties and stability of almond and hazelnut milks. *LWT - Food Science and Technology*, 62 (1), 488–496.
- Berner, L. A. & Miller, D. D. (1985). Effects of dietary proteins on iron bioavailability – A review. *Food Chemistry*, 18, 47-69.
- Beverung, C. J., Radke, C. J. & Blanch, H. W. (1999). Protein adsorption at the oil/water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements. *Biophysical Chemistry*, 81 (1), 59–80.

- Bijsterbosch, B. H., Bos, M. T. A., Dickinson, E., Van Opheusden, J. H. J. & Walstra, P. (1995). Brownian dynamics simulations of particle gel formation: from argon to Yoghurt. *Faraday Discussions*, 101, 51-64.
- Birk, Y. (1961). Purification and some properties of a highly active inhibitor of  $\alpha$ -chymotrypsin from soybeans. *Biochimica et Biophysica Acta*, 54, 378-381.
- Bolumar, T., Skibsted, L. H. & Orlien, V. (2012). Kinetics of the formation of radicals in meat during high pressure processing. *Food Chem*, 134, 2114–2120.
- Bolumar, T., Georget, E. & Mathys A. (2015). 8 - High pressure processing (HPP) of foods and its combination with electron beam processing. En: *Electron Beam Pasteurization and Complementary Food Processing Technologies*, primera edición. Woodhead Publishing Limited.
- Boonyaratanakornkit, B. B., Park, C. B. & Clark, D. S (2002). Pressure effects on intra and intermolecular interactions within proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1595 (1-2), 235–249.
- Bos, M. A. & van Vliet, T. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: A Review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 91 (3), 437–471.
- Bouaouina, H., Desrumaux, A., Liosel, C. & Legrand, J. (2006). Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. *International Dairy Journal*, 16, 275-284.
- Bourne, M. C. (2002). Sensory methods of texture and viscosity measurement. En: *Food Texture and Viscosity*. Segunda edición. Academic Press, New York.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Bremer, L. G. B. (1992). Fractal aggregation in relation to formation and properties of particle gels, Ph.D. Thesis.
- Bridgman, P. W. (1914). The coagulation of albumin by pressure. *The Journal of Biological Chemistry*, 19 (1), 511.
- Brown, T. L., LeMay, H. E. Jr., Bursten, B. E. & Murphy, C. J. (2009). En: *Química, la ciencia central*. Decimoprimer edición, Pearson Educación, México.

- Buchheim, W., Schrader, K., Morr, C. V., Frede, E. & Schütt, M. (1996). Effects of high pressure on the protein, lipid and mineral phase of milk. *Heat treatments and alternative methods*, 202-213. Número especial 9602. Bruselas: International Dairy Federation.
- Burgess, D. J. & Sahin, N. O. (1997). Interfacial rheological and tension properties of protein films. *Journal of Colloid and Interface Science*, 189, 74-82.
- Cagna, A., Esposito, G., Riviere, C., Housset, S. & Verger, R. (1992). 33<sup>rd</sup> International Conference on Biochemistry of Lipids, Lyon, France.
- Camejo, G., Colacicco, G. & Rapport, M. M. (1968). Lipid monolayers: interactions with the apoprotein of high density plasma lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, 9, 562-569.
- Campbell, O. & Padilla-Zakour, O. (2013). Phenolic and carotenoid composition of canned peaches (*Prunus persica*) and apricots (*Prunus armeniaca*) as affected by variety and peeling. *Food Research International*, 54(1), 448-455.
- Canabady-Rochelle, L. S. & Mellema, M. (2010). Physical-chemical comparison of cow's milk proteins versus soy proteins in their calcium-binding capacities. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 366 (1-3), 110–112.
- Cano, M. & de Ancos, B. (2005). 13 - Advances in Use of High Pressure to Processing and Preservation of Plant Foods. En: *Novel Food Processing Technologies*. CRC Press, EEUU.
- Carbonell-Capella, J. M., Barba, F. J., Esteve, M. J. & Frígola, A. (2013). High pressure processing of fruit juice mixture sweetened with Stevia rebaudiana Bertoni: optimal retention of physical and nutritional quality. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 18, 48–56.
- Cascão Pereira, L. G., Théodoly, O., Blanch, H. W. & Radke, C. J. (2003). Dilatational rheology of BSA conformers at the air/water interface. *Langmuir*, 19 (6), 2349–2356.
- Castellani, O., Al-Assaf, S., Axelos, M., Phillips, G. O. & Anton, M. (2010). Hydrocolloids with emulsifying capacity. Part 2 – Adsorption properties at the n-hexadecane-water interface. *Food Hydrocolloids*, 24, 121-130.
- Chaiwanon, P., Puwastien, A., Nitithamyong, A. & Sirichakwal, P. P. (2000). Calcium fortification in soybean milk and in vitro bioavailability. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13 (4), 319–327.

- Chalikian, T. V.; Sarvazyan, A. P. & Breslauer, K. J. (1993). Partial molar volumes, expansibilities, and compressibilities of  $\alpha,\omega$ -aminocarboxylic acids in aqueous solutions between 18 and 55 °C. *J. The Journal of Physical Chemistry*, 97 (49), 13017–13026.
- Cheftel, J. C., Cuq, J. L. & Lorient, D. (1985). Amino acids, peptides, and proteins. En: *Food Chemistry*. Marcel Dekker, New York.
- Chen, S. (2006). Génesis sobre la preparación de la leche de soja. *Aceites y Grasas*, 16, 238-251.
- Chen, D., Pang, X., Zhao, J., Gao, L., Liao, X., Wu, J. & Li, Q. (2015). Comparing the effects of high hydrostatic pressure and high temperature short time on papaya beverage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 32, 16–28.
- Ciani, R. (2014). Derivados de la industrialización de soja: Harina y Aceite. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Presidencia de la Nación. Período: 2007/08-2012/13.
- Cilla, A., Alegría, A., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., Plaza, L., Clemente, G., Lagarda, M. J. & Barberá, R. (2012). Bioaccessibility of tocopherols, carotenoids, and ascorbic acid from milk- and soy-based fruit beverages: Influence of food matrix and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (29), 7282–7290.
- Coad, J., Stewart, R. & Pedley, K. (2016). Iron: physiology of iron. En: *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, volumen 3.
- Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular. Base de datos on-line: <http://enzyme.expasy.org/>
- Couper, A. (1993). 1- Surface tension and its measurement. En: *Physical Methods of Chemistry. Volumen IX.A. Investigations of Surfaces and Interfaces*. John Wiley & Sons, New York.
- Crawford, Y. J., Murano, E. A., Olson, D. G. & Shenoy, K. (1996). Use of high hydrostatic pressure and irradiation to eliminate *Clostridium sporogenes* spores in chicken breast. *Journal of Food Protection*, 59 (7), 711–715.

- Cruz, N., Capellas, M., Hernández, M., Trujillo, A. J., Guamis, B. & Ferragut, V. (2007). Ultra high pressure homogenization of soymilk: Microbiological, physicochemical and microstructural characteristics. *Food Research International*, 40 (6), 725–732.
- De Vries, A. J. (1958). Foam stability. Part V. Mechanism of film rupture. *Recueil des Travaux Chimiques*, 77, 383.
- Delbyshire, E., Wright, D. J. & Boulter, D. (1976). Legumin and vicilin storage protein of legume seeds. *Phytochemistry*, 15, 3-24.
- Demetriades, K., Coupland, J. N. & McClements, D. J. (1997). Physical properties of whey protein stabilized emulsions as related to pH and NaCl. *Journal of Food Science*, 62, 342.
- Denoya, G. (2015). Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre la calidad y vida útil de duraznos minimamente procesados. Aspectos bioquímicos, fisicoquímicos, higiénico-sanitarios, nutricionales y sensoriales. Tesis doctoral, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
- Derringer, G. & Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of quality technology*, 12 (4), 214-219.
- Derringer, G. C. (1994). A balancing act: optimizing a product's properties. *Quality progress*, 27 (6), 51-58.
- Desobry-Banon, S., Richard, F. & Hardy, J. (1994). Study of acid and rennet coagulation of high pressurized milk. *Journal of Dairy Science*, 77 (11), 3267–3274.
- Dezelic, G., Dezelic, N. & Tezak, B. (1963). A simple method for particle size determination by turbidity measurement. *Journal of Colloid Science*, 18, (9), 888-892.
- Dickinson, E., Stainsby, G. (1982). *Colloids in Foods*, Elsevier, Reino Unido.
- Dickinson, E. & Matsumura, Y. (1991). Time-dependent polymerization of  $\beta$ -lactoglobulin through disulphide bonds at the oil-water interface in emulsions. *International Journal of Biology and Macromolecules*, 13, 26.
- Dickinson, E. (1992). *Introduction to Food Colloids*. Oxford University Press, Reino Unido.
- Dickinson, E., Hunt, J. A. & Horne, D. S. (1992). Calcium induced flocculation of emulsions containing adsorbed  $\beta$ -casein or phosphovitin. *Food Hydrocolloids*, 6 (4), 359–370.

- Dickinson, E., Owusu, R. K. & Williams, A. (1993). Orthokinetic destabilization of a protein-stabilized emulsion by a water-soluble surfactant. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 89, 865-866.
- Dickinson, E., Goller, M. I. & Wedlock, D. J. (1995). Osmotic pressure, creaming and rheology of emulsions containing non-ionic polysaccharide. *Journal of Colloid and Interface Science*, 172, 192.
- Dickinson, E. & Golding, M. (1997a). Rheology of sodium caseinate stabilized oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 191, 166.
- Dickinson, E. & Golding, M. (1997b). Depletion flocculation of emulsions containing unadsorbed sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 11, 13.
- Dickinson, E. (1999). Adsorbed protein layers at fluid interfaces: Interactions, structure and surface rheology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 15, 161-176.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25.
- DiPietro, C. M. & Liener, I. E. (1989). Heat inactivation of the Kunitz and Bowman-Birk soybean protease inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 39-43.
- Doehlert, D. H. (1970). Uniform shell designs. *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)*, 19 (3), 231-239.
- Doty, P. & Steiner, R. F. (1950). Light scattering and spectrophotometry of colloidal solutions. *Journal of Chemical Physics*, 18, 1211-1220.
- Elgasim, E.A. & Kennick, W. H. (1982). Effect of high hydrostatic pressure on meat microstructure. *Food Microstructures*, 1, 75-82.
- Eskin, N. A. M., Grossman, S. Pinsky, A. & Whitaker, J. R. (1977). Biochemistry of lipoxygenase in relation to food quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 9, 1.
- Evans, M. T. A., Mitchell, J., Mussellwhite, P. R. & Irons, L. (1970). En: *Surface Chemistry of Biological systems*. Plenum Press, New York.
- Evans, D. F. & Wennerstrom, H. (1994). En: *The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet*. Primera edición. VCH Publishers, New York.
- Everett, D. H. (1988). *Basis Principles of Colloid Science*. Royal Society of Chemistry, Reino Unido.

- Faergemand, M., Murray, B. S. & Dickinson, E. (1997). Cross-linking of milk proteins with transglutaminase at the oil-water interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2514-2519.
- Farr, D. (1990). High pressure technology in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 1, 14–16.
- Filippi, M. V., Genovese, D. B. & Lozano, J. E. (2008). 29 – Zeta potential as a way to determine optimal conditions during fruit juice clarification. En: *Food Engineering: Integrated Approaches*. Springer, New York.
- Freer, E. M., Yim, K. S., Fuller, G. G. & Radke, C. J. (2004). Interfacial rheology of globular and flexible proteins at the hexadecane/water interface: Comparison of shear and dilatation deformation. *Journal of Physical Chemistry B*, 108, 3835 – 3844.
- Frye, K. J. & Royer, C. A. (1998). Probing the contribution of internal cavities to the volume change of protein unfolding under Pressure. *Protein Science*, 7 (10), 2217–2222.
- Galazka, V. B., Ledward, D. A., Dickinson, E. & Langley, K. R. (1995). High pressure effects on emulsifying behavior of whey protein concentrate. *Journal of Food Science*, 60, 1341-1343.
- Galazka, V. B., Dickinson, E. & Ledward, D. A. (1996). Effect of high pressure on the emulsifying behavior of  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 10, 213-219.
- Garcia-Palazon, A., Suthanthangjai, W., Kajda, P. & Zabetakis, I. (2004). The effects of high hydrostatic pressure on  $\beta$ -glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus Idaeus*) and strawberry (*Fragaria X Ananassa*). *Food Chemistry*, 88, 7–10.
- Garriga, M., Grèbol, N., Aymerich, M. T., Monfort, J. M. & Hugas, M. (2004). Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5 (4), 451–457.
- Genovese, D. B. & Lozano, J. E. (2001). The effect of hydrocolloids on the stability and viscosity of cloudy apple juices. *Food Hydrocolloids*, 15 (1), 1–7.
- González, R. & Carrillo, D. (1987). *Nutrición humana*. Manual de prácticas. 34-36. Editorial: Pueblo y Educación, La Habana, Cuba.
- Grant, G. (1989). Anti-nutritional effects of soybean, a review. *Progress in Food & Nutrition Science*, 13, 317-348.

- Grigera, J. R. & McCarthy, A. N. (2010). The behavior of the hydrophobic effect under pressure and protein denaturation. *Biophysical Journal*, 98 (8), 1626–1631.
- Guerrero-Beltrán, J.A., Estrada-Girón, Y., Swanson, B. G. & Barbosa-Cánovas, G. V. (2009). Pressure and temperature combination for inactivation of soymilk trypsin inhibitors. *Food Chemistry*, 116 (3), 676–679.
- Gumbmann, M. R., Dugan, G. M., Spangler, W. L., Baker, E. C. & Rackis, J. J. (1989). Pancreatic response in rats and mice to trypsin inhibitors from soy and potato after short- and long-term dietary exposure. *Journal of Nutrition*, 119, 1598-1609.
- Hackler, I. R., van Buran, J. P., Streinkraus, K. H., Rawi, I. & Hand, D. B. (1965). Effect of heat treatment on nutritive value of soymilk protein fed to weanling rats. *Journal of Food Science*, 30, 723-738.
- Hackler, L. R. & Stillings, B. R. (1967). Amino acid composition of heat-processed soymilk and its correlation with nutritive value. *Cereal Chemistry*, 44, 70-77.
- Hall, D., Zhao, R., Dehlsen, I., Bloomfield, N., Williams, S. R., Arisaka, F., Goto, Y. & Carver, J. A. (2016). Protein aggregate turbidity: simulation of turbidity profiles for mixed aggregation reactions. *Analytical Biochemistry*. Article in press.
- Hamann, S. D. (1980). The role of electrostriction in high pressure chemistry. *The Review of Physical Chemistry of Japan*, 50, 147-168.
- Harrington, J. (1965). The desirability function. *Industrial quality control*, 21, 494-498.
- Hawley, S. A. (1971). Reversible pressure-temperature denaturation of chymotrypsinogen. *Biochemistry*, 10, 2436-2442.
- Hayashi, R. (1995). Advances in high pressure processing technology in Japan. En: *Food Processing: Recent Developments*. Elsevier, Reino Unido.
- Hayes, W. A., Smith, P. G. & Morris, A. E. J. (1998). The production and quality of tomato concentrates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38 (7), 537-564.
- Hei, D. J. & Clark, D. S. (1994). Pressure stabilization of proteins from extreme thermophiles. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (3), 932–939.
- Heinisch, O., Kowalski, E., Goossens, K., Frank, J., Heremans, K., Ludwig, H. & Tauscher, B. (1995). Pressure effects on the stability of lipoxygenase: Fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR) and enzyme activity studies. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und –Forschung*, 201(6), 562–565.
- Heinz, V. & Buckow, R. (2010). Food preservation by high pressure. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 5(1), 73-81.

- Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., & Weemaes, C. (1998). Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science & Technology*, 9(5), 197-203.
- Heremans, K. & Smeller, L. (1998). Protein structure and dynamics at high pressure. *Biochemical et Biophysical Acta*, 1386, 353-370.
- Heremans, K., Meersman, F., Pfeiffer, H., Rubens, P. & Smeller, L. (2000). Pressure effects on biopolymer structure and dynamics. *High Pressure Research*, 19, 233-240.
- Hermansson, A. M. (1978). Physico-chemical aspects of soy proteins structure formation. *Journal of Texture Studies* 9, 33-58.
- Hiemenz, P. C., & Rajagopalan, R. (1997). En: *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. Tercera Edición. Marcel Dekker, New York.
- Hiperbaric. Información de la página web de esta empresa proveedora de equipos de Altas Presiones Hidrostáticas: <http://www.hiperbaric.com/en/high-pressure> (Actualizada Enero 2015)
- Hite, B.H. (1899) The effect of pressure in the preservation of milk. West Virginia University. Agr. Expt. Sta., Morgantown. Bulletin, 58, 15.
- Hogan, E., Kelly, A. L. & Sun, D-W. (2005). High pressure processing of foods: an overview. En: *Emerging Technologies for Food Processing*, primera edición, editado por Da-Wen Sun. Academic Press.
- Holm, H., Reseland, J. E., Thorsen, L. I., Flatmark, A. & Hanssen, I. E. (1992). Raw soybeans stimulate human pancreatic proteinase secretion. *Journal of Nutrition*, 122, 1407-1416.
- Hoover, D. G., Metrick, C., Papineau, A. M., Farkas, D. F. & Knorr, D. (1989). Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technology*, 43 (3), 99–107.
- Hoover, D. G. (1993). Pressure effects on biological systems. *Food Technology*, 47, 150–155.
- Hugas, M., Garriga, M. & Monfort, J. M. (2002). New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Science*, 62 (3), 359–371.
- Hummer, G., Garde, S., Garcia, A. E., Paulaitis, M. E. & Pratt, L. R. (1998). The pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins. *National Academy of Sciences of the United States of America* 95:1552-1555.

- Hunter, R. J. (1986). *Foundations of Colloid Science*. Volumen 1, Oxford University Press, Oxford.
- Hunter, R.J. (1989). *Foundations of Colloid Science*. Volumen 2, Oxford University Press, Oxford, UK.
- Huppertz, T., Fox, P. F. & Kelly, A. L. (2004). Dissociation of casein in high pressure-treated bovine milk. *International Dairy Journal*, 14, 675-680.
- Huppertz, T., Kelly, A. L. & de Kruif, C. G. (2006). Disruption and reassociation of casein micelles under high pressure. *Journal of Dairy Research*, 73, 294-298.
- Indrawati, A., van Loey, A. M., Ludikhuyze, L. R. & Hendrickx, M. (1999). Single, combined, or sequential action of pressure and temperature on lipoxygenase in green beans (*Phaseolus vulgaris* L.): A kinetic inactivation study. *Biotechnology Progress*, 15(2): 273-277.
- Israelachvili, J. N. (1992). *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press, Reino Unido.
- Ivanov, I. B., Danov, K. D. & Kralchevsky, P. A. (1999). Flocculation and coalescence of micron-size emulsion droplets. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152, 161.
- Iwabuchi, S. & Yamauchi, F. (1987). Electrophoretic analysis of whey proteins present in soybean globulin fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35 (2), 205–209.
- Jaenicke, R. (1982). Enzymes under extreme conditions. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 10, 1–5.
- Jenkins, P. & Snowden, M. (1996). Depletion flocculation in colloidal dispersions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 68, 57.
- Kale, R. V., Pandhare, G. R., Satwase, N. A. & Goswami, D. (2012). Effect of different concentration of orange juice on quality characteristics of soya milk blended beverage. *Journal of Food Processing Technology*, 3, 140.
- Kauzmann W. (1987). Thermodynamics of unfolding. *Nature*, 325, 763–764.
- Keerati-u-rai, M. & Corredig, M. (2009). Heat-induced changes in oil-in-water emulsions stabilized with soy protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 23, 2141-2148.
- Kella, N. K. D., Barbeau, W. E. & Kinsella, J. E. (1986). Effect of oxidative sulfitolysis of disulfide bonds of glycinin on solubility, surface hydrophobicity , and in vitro digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 11, 251–256.

- Kitamura, K., Takagi, T. & Shibasaki, K. (1976). Renaturation of soybean 11S globulin. *Agricultural Biological Chemistry*, 40, 1837-1844.
- Kitamura, Y. & Itoh, T. (1987). Reaction volume of protonic ionization for buffering agents. Prediction of pressure dependence of pH and pOH. *Journal of Solution Chemistry*, 16 (9), 715–725.
- Kitamura, K. (2010). All about soybeans. Tokyo: *Science Forum*.
- Kjeldahl, J. (1883). Neue method zur bestimmung des stickstoffs in organischen körpern. *Zeitschrift für Analytische Chemie*, 22, 366-382.
- Knorr, D., Heinz, V. & Buckow, R. (2006). High pressure application for food biopolymers. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1764 (3), 619–631.
- Koide, T. & Ikenaka, T. (1973). Studies on soybean trypsin inhibitors III. Aminoacid sequence of the carboxyl-terminal region and the complete amino acid sequence of soybean trypsin inhibitor. *European Journal of Biochemistry*, 32, 417-431.
- Korkut, S. (2012). Performance of three thermally treated tropical wood species commonly used in Turkey. *Industrial Crops and Products*, 36 (1), 355–362.
- Koshiyama, I. (1968). Chromatographic and sedimentation behavior of a purified 7S protein in soybean globulins. *Cereal Chemistry*, 45, 405-412.
- Koshiyama, I., Kikuchi, M. & Fukushima, D. (1981). 2S Globulins of soybean seeds. 2. Physicochemical and biological properties of protease inhibitors in 2S Globulins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 340–343.
- Koutchma, T. (2014). Adapting High Hydrostatic Pressure (HPP) for Food Processing Operations. Academic Press, USA.
- Kris-Etherton, P. M. K., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Griel, A. E. & Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*. 113, 71S–88S.
- Kroll, R. D. (1984). Effect of pH on the binding of calcium ions by soybean proteins. *Cereal Chemistry*, 61, 490-495.
- Kubo, M. T. K., Augusto, P. E. D. & Cristianini, M. (2013). Effect of high pressure homogenization (HPH) on the physical stability of tomato juice. *Food Research International*, 51 (1), 170–179.
- Kwok, K. C., Qin, W. H. & Tsang, J. C. (1993). Heat inactivation of trypsin inhibitors in soymilk at ultra-high temperatures. *Journal of Food Science*, 58, 859-862.

- Kwok, K. C. & Niranjana, K. (1995). Effect of thermal-processing on soymilk. *International Journal of Food Science and Technology*, 30 (3), 263-295.
- Kwok, K. C., Yui Wah, S., Chi Hung, Y. & Keshavan, N. (1998). Effect of thermal processing on available lysine, thiamine and riboflavin content in soymilk. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 77, 473-478.
- Kwok, K. C., Liang, H. H. & Niranjana, K. (2002). Optimizing conditions for thermal processes of soy milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (17), 4834-4838.
- Kwon, D. Y., Oh, S. W., Lee, J. S., Yang, H. J., Lee, S. H. & Lee, J.H. (2002). Amino acid substitution of hypocholesterolemic peptide originated from glycinin hydrolyzate. *Food Science and Biotechnology*, 11:55–61.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lakshmanan, R., de Lamballerie, M. & Jung, S. (2006). Effect of soybean-to-water ratio and pH on pressurized soymilk properties. *Journal of Food Science*, 71 (9), 1–8.
- Latunde-Dada, G. O. (2016). Iron: Biosynthesis and significance of heme. En: *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, volumen 3.
- Le Denmat, M., Anton, M. & Beaumont, V. (2000). Characterisation of emulsion properties and of interface composition in O/W emulsions prepared with hen egg yolk, plasma and granules. *Food Hydrocolloids*, 14 (6), 539–549.
- Li, T. M., Hock, J. W., Drickamer, H. G. & Weber, G. (1976). Plurality of pressure-denatured forms in chymotrypsinogen and lysozyme. *Biochemistry*, 15, 5571-5580.
- Li, J. B., Zhang, Y. & Yan, L. L. (2001). Multilayer formation on a curved drop surface. *Angewandte Chemie International Edition*, 40, 891-894.
- Liener, I. E. (1994). Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34 (1), 31-67.
- Liu, K. (1997). Soybeans: chemistry, Technology and Utilization. Primera edición, Chapman and Hall, New York.
- Liu, C., Teng, Z., Lu, Q. Y., Zhao, R. Y., Yang, X. Q., Tang, C. H. & Liao, J. M. (2011). Aggregation kinetics and  $\zeta$ -potential of soy protein during fractionation. *Food Research International*, 44 (5), 1392–1400.
- Losso, J. N., Munene, C. N., Bansode, R. R. & Bawade, H. A. (2004). Inhibition of matrix metalloproteinase-1 activity by the soybean Bowman–Birk inhibitor. *Biotechnology Letters*, 26, 901-905.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Lucassen, J. & Barnes, G. T. (1972). Propagation of Surface tension changes over a surface with limited area. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, 68, 2129-2138.
- Lucassen, J. & van del Tempel, M. (1972). Dynamical measurements of dilational properties of a liquid interface. *Chemical Engineering Science*, 27, 1283-1291.
- Ludikhuyze, L., Indrawati, I., Van den Broeck, C., Weemaes, C. & Hendrickx, M. (1998). Effect of combined pressure and temperature on soybean lipoxygenase. 1. Influence of extrinsic and intrinsic factors on isobaric-isothermal inactivation kinetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4074-4080.
- Luttrell, W. R., Wei, L. S., Nelson, A. I. & Steinberg, M. P. (1981). Cooked flavor in sterile Illinois soybean beverage. *Journal of Food Science*, 46, 373-376-382.
- Luyten, H., Jonkman, M., Kloek, W. & van Vliet, T. (1993). Creaming behaviour of dispersed particles in dilute xanthan solutions. En: *Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties*. Royal Society of Chemistry, Reino Unido.
- Lynch, S. R., R., Dassenko, S. A., Cook, J. D., Juillerat, M. A & Hurrell, R. F. (1994). Inhibitory effect of a soybean-protein--related moiety on iron absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 60, (4), 567-572.
- Mackie, A. R., Gunning, A. P., Ridout, M. J., Wilde, P. J. & Patino, J. R. (2001). In situ measurement of the displacement of protein films from air/water interface by surfactant. *Biomacromolecules*, 2, 1001-1006.
- Makino, S., Nakashima, H., Minami, K., Moriyama, R. & Takao, S. (1988). Bile acid-binding protein from soybean seed: isolation, partial characterization and insulin-stimulating activity. *Agricultural Biological Chemistry*, 52: 803-809.
- Malaki Nik, A., Tosh, S. M., Woodrow, L., Poysa, V. & Corredig, M. (2009). Effect of soy protein subunit composition and processing conditions on stability and particle size distribution of soymilk. *LWT - Food Science and Technology*, 42 (7), 1245-1252.
- Malhotra, A. & Coupland, J. N. (2004). The effect of surfactants on the solubility, zeta potential, and viscosity of soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 18 (1), 101-108.

- Manassero, C. A., Vaudagna, S. R., Añón, M. C. & Speroni, F. (2015). High hydrostatic pressure improves protein solubility and dispersion stability of mineral-added soybean protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 43, 629–635.
- Markwell, M. A., Haas, S. M., Bieber, L. L. & Tolbert, N. E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein amples. *Analytical Biochemistry*, 87 (1), 206–210.
- Márquez, A. L., Salvatore, G. N., Otero, R. G., Wagner, J. R. & Palazolo, G. G. (2015). Impact of freeze-thaw treatment on the stability of calcium-fortified soy beverages. *LWT-Food Science and Technology*, 62, 474-481.
- Matei, N., Popescu, A., Munteanu, M. & Lucian Radu, G. (2013). The assessment of Cd, Zn, Pb, Cu and vitamin C in peaches. *U.P.B. Scientific Bulletin, Series B*, 75(1), 73-79.
- Matz, S.A. (1962). *Food Texture*. Avi, Westport, Connecticut.
- Mazur, A. & Maier, J. A. M. (2016). Magnesium – An essential mineral. En: *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, volumen. 3.
- McClements, D. J. (2000). Comments on viscosity enhancement and depletion flocculation by polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 14, 173.
- McClements, J. M. J., Patterson, M. F. & Linton, M. (2001). The effect of growth stage and growth temperature on high hydrostatic pressure inactivation of some psychrotrophic bacteria in milk. *Journal of Food Protection*, 64 (4), 514–522.
- McClements, D. J. (2005). En: *Food Emulsions. Principles, Practices, and Techniques*. Segunda edición, CRC Press.
- McKenna, B. M. (1990). *The Liquid and Solid Properties of Foods – A Bibliography*. Food Science Publishers, Reino Unido.
- McKenna, B. M. (2003). Texture in Food. En: *Semi-Solid Foods Volume 1*, Woodhead Publishing, Cambridge, Reino Unido.
- Mckenna, B. M. & Lyng, J. G. (2013). Principles of food viscosity analysis. *Instrumental Assessment of Food Sensory Quality: A Practical Guide*, 129-162. Woodhead Publishing Limited.
- Mertens, B. (1995). Hydrostatic pressure treatment of food: equipment and processing. En: *New Methods of Food Preservation*. Blackie Academic and Professional, Reino Unido.

- Michels, P. C., Hei, D. & Clark, D. S. (1996). Pressure effects on enzyme activity and stability at high temperatures. *Advances in Protein Chemistry*, 48, 341–376.
- Michels, K. V., Giovannucci, E., Joshipura, K. J., Rosner, B. A., Stampfer, M. J., Fuchs, C. S., Colditz, G. A., Speizer, F. E. & Willett, W. C. (2000). Prospective study of fruit and vegetable consumption and incidence of colon and rectal cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 1740–1752.
- Min, S., Jin, Z. T. & Zhang, Q. H. (2003). Commercial scale pulsed electric field processing of tomato juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (11), 3338–3344.
- Min, S. K., Samaranayake, C. P. & Sastry, S. K. (2011). In situ measurement of reaction volume and calculation of pH of weak acid buffer solutions under high pressure. *Journal of Physical Chemistry B*, 115 (20), 6564–6571.
- Mitchell, J., Irons, L. & Palmer, G. J. (1970). A study of the spread and adsorbed films of milk proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 200 (1), 138-150.
- Molina, M. I. & Wagner, J. R. (1999). The effects of divalent cations in the presence of phosphate, citrate and chloride on the aggregation of soy protein isolate. *Food Research International*, 32, 135-143.
- Molina, E., Papadopoulou, A. & Ledward, D. A. (2001). Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. *Food Hydrocolloids*, 15, 263-269.
- Mori, T., Utsumi, S. & Inaba, H. (1979). Interaction involving disulfide bridges between subunits of soybean seed globulin and between subunits of soybean and sesame seed globulins. *Agricultural and Biological Chemistry*, 43(11), 2317-2322.
- Mozhaev, V. V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P. & Balny, C. (1994). Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 12 (12), 493–501.
- Needs, E. C., Stenning, R. A., Gill, A. L., Ferragut, V. & Rich, G. T. (2000). High-pressure treatment of milk: Effects on casein micelle structure and on enzymic coagulation. *Journal of Dairy Research*, 67 (1), 31–42.
- Nielsen, N. C. (1985). The structure and complexity of the 11S polypeptides in soybeans. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62 (12), 1680-1686.

- Nino, M. R. R., Patino, J. M. R., Sanchez, C. C., Fernandez, M. C. & Garcia, J. M. (2003). Physicochemical characteristics of food lipids and proteins at fluid–fluid interfaces. *Chemical Engineering Communications*, 190, 15.
- Nishinari, K., Fang, Y., Guo, S. & Phillips, G. O. (2014). Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocolloids* 39, 301–318.
- Norton, T. & Sun, D. (2008). Recent advances in the use of high pressure as an effective processing technique in the food industry. *Food and Bioprocess Technology*, 1(1), 2-34.
- Odani, S., Koide, T. & Ikenaka, T. (1972). Studies on soybean trypsin inhibitor. III. Isolation and sequence determination on the tryptic peptides of Bowman-Birk soybean proteinase inhibitor. *Journal of Biochemistry*, 71, 831-838.
- Oey, I., Lille, M., van Loey, A. & Hendrickx, M. (2008). Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit- and vegetable-based food products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 19 (6), 320–328.
- Okoth, M. W., Kaahwa, A. R. & Imungi, J. K. (2000). The effect of homogenisation, stabiliser and amylase on cloudiness of passion fruit juice. *Food Control*, 11 (4), 305–311.
- Olsson, S. (1995). 12 - Production equipment for commercial use. En: *High Pressure Processing of Foods*. Nottingham University Press.
- Ono, T., Rak Choi, M., Ikeda, A. & Odagiri, S. (1991). Changes in the composition and size distribution of soymilk protein particles by heating. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55 (9), 2291–2297.
- Ono, T., Katho, S. & Mothizuki, K. (1993). Influences of calcium and pH on protein solubility in soybean milk. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57 (1), 24-28.
- Ormando P., Vranic M. L., Sanow C., Larreteguy A. E. & Vaudagna S. R. (2015a). Incremento de la Temperatura del Fluido de Presurización Durante el Ciclo de Altas Presiones Hidrostáticas. *XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL)*. Buenos Aires, Argentina.
- Ormando, P., Vranic, M. L., Sanow, C., Larreteguy, A. E. & Vaudagna, S. R. (2015b). Procesamiento con Altas Presiones Hidrostáticas: Evaluación del Incremento de Temperatura del Fluido en Función del Uso, Nivel de Presión y Distribución Dentro del Equipo. *XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL)*. Buenos Aires, Argentina.

- Otero, L., Ramos, A. M., de Elvira, C. & Sanz, P. D. (2007). A model to design high-pressure processes towards an uniform temperature distribution. *Journal of Food Engineering*, 78 (4), 1463–1470.
- Palazolo, G. G. & Wagner, J. R. (2010). Estabilidad a la congelación/descongelación de emulsions o/w preparadas con aislados de soja nativos y desnaturalizados con diferente solubilidad. *Innotec*, 5, 66-68.
- Palazolo, G. G., Sobral, P. A. & Wagner, J. R. (2011). Freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions prepared with native and thermally denatured isolates. *Food Hydrocolloids*, 25 (3), 398-409.
- Palazolo, G. G., Sobral, P. A. & Wagner, J. R. (2013). Dehydrated tofu whey as cryoprotectant in protein-stabilized oil-in-water emulsions. *LWT-Food Science and Technology*, 50, 773-781.
- Palou, E., Lopez-Malo, A., Barbosa-Canovas, G.V. & Welti-Chanes, J. (2000). High hydrostatic pressure and minimal processing. En: *Minimally Processed Fruits and Vegetables. Fundamentals and Applications*. Aspen, Gaithersburg, MD.
- Palou, E., Lopez-Malo, A. & Welti-Chanes, J. (2002). 43 - Innovative fruit preservation using high pressure. En: *Engineering and Food for the 21st Century*. Food Preservation Technology Series, Boca Raton: CRC Press.
- Pathomrungsinyounggul, P., Grandison, A. S. & Lewis, M. J. (2007). Effects of calcium chloride and sodium hexametaphosphate on certain chemical and physical properties of soymilk. *Journal of Food Science*, 72 (8), 428–434.
- Pathomrungsinyounggul, P., Lewis, M. J. & Grandison, A. S. (2010). Effects of calcium-chelating agents and pasteurisation on certain properties of calcium-fortified soy milk. *Food Chemistry*, 118 (3), 808–814.
- Pathomrungsinyounggul, P., Grandison, A. S. & Lewis, M. J. (2012). Feasibility of using dialysis for determining calcium ion concentration and pH in calcium-fortified soymilk at high temperature. *Journal of Food Science*, 77 (1), 10-16.
- Patton, S. & Huston, G. H. (1986). A Method for Isolation of milk fat globules. *Lipids*, 21 (2), 170–174.
- Peeters, P. H., Keinan-Boker, L., van Der Schouw, Y. T. & Grobbee, D. E. (2003). Phytoestrogens and breast cancer risk: Review of the epidemiological evidence. *Breast Cancer Research and Treatment*. 77: 171-183.

- Pérez, O. E., Carrera Sánchez, C., Pilosof, A. M. R. & Rodríguez Patino, J. M. (2015). Impact of hydroxypropylmethylcellulose on whey protein concentrate spread film at the air-water interface: Structural and surface dilatational characteristics. *Colloid and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 465, 1-10.
- Petruccelli, S. & Añón, M. C. (1994). Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 1. Structural and hydration properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(10), 2161–2169.
- Polisel-Scopel, F. H., Hernández-Herrero, M., Guamis, B. & Ferragut, V. (2012). Comparison of ultra high pressure homogenization and conventional thermal treatments on the microbiological, physical and chemical quality of soymilk. *LWT - Food Science and Technology*, 46 (1), 42–48.
- Polisel-Scopel, F. H., Hernández-Herrero, M., Guamis, B. & Ferragut, V. (2013). Characteristics of soymilk pasteurized by ultra high pressure homogenization (UHPH). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20, 73–80.
- Polisel-Scopel, F. H., Hernández-Herrero, M., Guamis, B. & Ferragut, V. (2014). Sterilization and aseptic packaging of soymilk treated by ultra high pressure homogenization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 22, 81–88.
- Prior, R. L.; Cao, G. (2000). Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implications. *HortScience*, 35, 588–592.
- Puppo, C., Chapleau, N., Speroni, F., de Lamballerie-Anton, M., Michel, F., Añón, C. & Anton, M. (2004). Physicochemical modifications of high-pressure-treated soybean protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1564-1571.
- Puppo, M. C., Speroni, F., Chapleau, N., de Lamballerie, M., Añón, M. C. & Anton, M. (2005). Effect of high-pressure treatment on emulsifying properties of soybean proteins. *Food Hydrocolloids*, 19 (2), 289–296.
- Qiu, W., Jiang, H., Wang, H. & Gao, Y. (2006). Effect of high hydrostatic pressure on lycopene stability. *Food Chemistry*, 97 (3), 516–523.
- Rackis, J. J., Wolf, W. J. & Baker, E. C. (1986). Protease inhibitor in plant foods: Content and inactivation. En: *Nutritional and Toxicological Significance of Enzyme inhibitors in Foods*. Mendel Friedman Plenum Publishing Corporation.
- Rasanayagam, V., Balasubramaniam, V. M., Ting, E., Sizer, C. E., Bush, C. & Anderson, C. (2003). Compression heating of selected fatty food materials during high-pressure processing. *Journal of Food Science*, 68(1):254– 259.

- Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Balasubramaniam, V. M., Niranjana, K. & Knorr, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47 (1), 69–112.
- Richardson, T., Hyslop, D. B. (1985). Enzymes. En: *Food Chemistry*. Marcel Dekker, New York.
- Robins, M. M., Watson, A. D. & Wilde, P. J. (2002). Emulsions – creaming and rheology. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 7, 419 – 425.
- Rodrigo, D., van Loey, A. & Hendrickx, M. (2007). Combined thermal and high pressure colour degradation of tomato puree and strawberry juice. *Journal of Food Engineering*, 79 (2), 553–560.
- Rodríguez Patino, J. M., Molina Ortiz, S. E., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Niño, M. R. & Añón, M. C. (2003). Dynamic properties of soy globulin adsorbed films at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 268, 50-57.
- Rodríguez Patino, J. M., Nino, M. R. R., Sanchez, C. C. (2003b). Structure, miscibility, and rheological characteristics of beta-casein-monoglyceride mixed films at the air-water interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 112.
- Rodríguez Patino, J. M., Ortiz, S. E. M., Sanchez, C. C., Nino, M. R. R. & Añón, M. C. (2003a). Behavior of soy globuling films at the air-water interface. Structural and dilatational properties of spread films. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 42, 5011.
- Romero, A., Beaumal, V., David-Briand, E., Cordobes, F., Anton, M. & Guerrero, A. (2011). Interfacial and emulsifying behavior of crayfish protein isolate. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 1603-1610.
- Romero, A., Beaumal, V., David-Briand, E., Cordobes, F., Guerrero, A. & Anton, M. (2012). Interfacial and emulsifying behaviour of rice protein concentrate. *Food Hydrocolloids*, 29 (1), 1–8.
- Roth, S. (2001). Etude de films protéiques aux interfaces huile/eau par tensiométrie et rhéologie interfaciale. Thèse, Université de Bourgogne.
- Royer, C. A. (2002). Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1595, 201–209.
- Sacco, S. M. & L'abbé, M. R. (2016). Calcium: physiology. En: *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, volumen 1.

- Sakhale, B.K., Pawar, V. N. & Ranwver, R. C. (2012). Studies on the development and storage of whey based RTS beverage from mango cv. Kesar. *Journal of Food Processing and Technology*, 3 (3), 148-151.
- Saláková, A., Straková, E., Válková, V., Buchtová, H. & Steinhäuserová, I. (2009). Quality indicators of chicken broiler raw and cooked meat depending on their sex. *Acta Veterinaria Brunensis*, 78 (3), 497–504.
- Samaranyake, C. P. & Sastry, S. K. (2010). In situ measurement of pH under high pressure. *Journal of Physical Chemistry B*, 114 (42), 13326–13332.
- Samaranyake, C. P. & Sastry, S. K. (2013). *In-Situ* pH measurement of selected liquid foods under high pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17, 22–26.
- Sanchez, C. C., Ortiz, S. E. M., Nino, M. R. R., Añon, M. C. & Rodríguez Patino, J.M. (2003). Effect of pH on structural, topographical, and dynamic characteristics of soy globulin films at the air-water interface. *Langmuir*, 19, 7478.
- Sarupria, S. & Garde, S. (2009). Quantifying water density fluctuations and compressibility of hydration shells of hydrophobic solutes and proteins. *Physical Review Letters*, 103 (3), 4–7.
- Scheider, W. L. (1983). *Nutrition: Basic concepts and applications*. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Schrader, K. & Buchheim, W. (1998). High pressure effects on the colloidal calcium phosphate and the structural integrity of micellar casein in milk. II. Kinetics of the casein micelle disintegration and protein interactions in milk. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 50 (1), 79–86.
- Scilingo, A. A. & Añón, M. C. (2004). Characterization of soybean protein isolates. The effect of calcium presence. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81 (1), 63–69.
- Scott, W. C., Kew, T. J. & Veldhuis, M. K. (1965). Composition of orange juice cloud. *Journal of Food Science*, 30, 833.
- Seyderhelm, I., Boguslawski, S., Michaelis, G. & Knorr, D. (1996). Pressure induced inactivation of selected food enzymes. *Journal of Food Science*, 61 (2), 308–310.
- Sherman, P. (1970). Rheology of dispersed systems. En *Industrial Rheology*. Academic Press Inc., Londres.
- Siddiq, M. (2006). 27- Peach and Nectarine. En: *Handbook of fruits and fruit processing*. Blackwell Publisher Ltd., Reino Unido.

- Silva, V. M., Kawazoe Sato, A. C., Barbosa, G., Dacanal, G. Ciro-Velásquez, H. J. & Lopes Cunha, R. (2010). The effect of homogenisation on the stability of pineapple pulp. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 2127–2133.
- Sistema de Estadísticas de Industrialización de Granos del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación (MAGyP, 2014).
- Smeller, L. (2002). Pressure-temperature phase diagrams of biomolecules. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1595, 11-29.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150 (1), 76–85.
- Smith, K., Mendonca, A. & Jung, S. (2009). Impact of high-pressure processing on microbial shelf-life and protein stability of refrigerated soymilk. *Food Microbiology*, 26 (8), 794–800.
- Smolin, N. & Winter, R. (2006). A molecular dynamics simulation of SNase and its hydration shell at high temperature and high pressure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1764 (3), 522–534.
- Sorgentini, D. A. & Wagner, J. R. (1999). Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins. *Journal of Food Biochemistry*, 23, 489-507.
- Speroni, F., Jung, S. & de Lamballerie, M. (2002). Effects of calcium and pressure treatment on thermal gelation of soybean protein. *Journal of Food Science*, 75 (1), 30-38.
- Speroni, F., Añón, M. C. & de Lamballerie, M. (2010). Effects of calcium and high pressure on soybean proteins: A calorimetric study. *Food Research International*, 43 (5), 1347–1355.
- Speroni, F., Milesi, V. & Añón, M. C. (2010). Interactions between isoflavones and soybeans proteins: Applications in soybean-protein-isolate production. *LWT-Food Science and Technology*, 43, 1265-1270.
- Sponton, O. E., Pérez, A. A., Carrara, C. R. & Santiago, L. G. (2015). Impact of environment conditions of physicochemical characteristics of ovalbumin heat-induced nanoparticles and on their ability to bind PUFAs. *Food Hydrocolloids*, 48, 165-173.

- Staswick, P. E., Hermodson, M. A. & Nielson, N. C. (1981). Identification of the acidic and basic subunit complexes of glycinin. *Journal of Biological Chemistry*, 256, 8752-8755.
- Staswick, P. E., Hermodson, M. A. & Nielson, N. C. (1984). Identification of cysteines which link the acidic and basic components of glycinin subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 259, 13431-13435.
- Steffe, J. F. (1996). En: *Rheological methods in food process engineering*. Segunda edición. Freeman Press, EEUU.
- Sun, M. M. C., Caillot, R., Mak, G., Robb, F. T. & Clark, D. S. (2001). Mechanism of pressure-induced thermostabilization of proteins: studies of glutamate dehydrogenases from the hyperthermophile *Thermococcus litoralis*. *Protein Science*, 10 (9), 1750–1757.
- Swaisgood, H. E. (1992). Chemistry of the caseins. En: *Advanced dairy chemistry-1: proteins*. Elsevier Applied Science, Reino Unido.
- Swientek, R. J. (1992). High hydrostatic pressure for food preservation. *Food Processing*, 53, 90–91.
- Tan, C. T. (2004). 12- Beverage emulsions. En: *Food Emulsions*. Cuarta edición. Marcel Dekker, New York.
- Tang, C. H. & Ma, C. Y. (2009). Effect of high pressure treatment on aggregation and structural properties of soy protein isolate. *LWT - Food Science and Technology*, 42 (2), 606–611.
- Tang, C. H., Wang, X. Y., Yang, W. Q. & Li, L. (2009). Formation of soluble aggregates from insoluble commercial soy protein isolate by means of ultrasonic treatment and their gelling properties. *Journal of Food Engineering*, 92, 432-437.
- Tangwongchai, R., Ledward, D. A. & Ames, J. M. (2000). Effect of high-pressure treatment on lipoxygenase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (7), 2896–2902.
- Tao, Y., Sun, D., Hogan, E. & Kelly, A. (2014). 1- High-Pressure Processing of Foods: An Overview. En: *Emerging technologies for food processing*. Segunda edición. Academic Press, EEUU.
- Tareen, M., Abbasi, N. & Hafiz, I. (2012). Postharvest application of salicylic acid enhanced antioxidant enzyme activity and maintained quality of peach cv. 'Flordaking' fruit during storage. *Scientia Horticulturae*, 142, 221-228.

- Terefe, N., Buckow, R. & Versteeg, C. (2014). Quality-Related Enzymes in Fruit and Vegetable Products: Effects of Novel Food Processing Technologies, Part 1: High-Pressure Processing. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 54(1), 24-63.
- Tewari, G. (2008). 12- High Pressure Processing of foods. En: *Advances in thermal and non-thermal food preservation*. John Wiley & Sons.
- Thanh, V. H. & Shibasaki, K. (1976). Heterogeneity of beta-conglycinin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 439, 326-338.
- Thanh, V. H. & Shibasaki, K. (1978). Major proteins of soybean seeds. Subunit structure of  $\beta$ -conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3), 692-695.
- Timson, W. J. & Short, A. J. (1965). Resistance of microorganisms to hydrostatic pressure. *Biotechnology and Bioengineering*, 7, 139–159.
- Tonello, C. (2011). 4 - Case Studies on High-Pressure Processing of Foods. En: *Nonthermal processing technologies for food*. Wiley-Blackwell, EEUU.
- Tonello, C. (2014). Advances in high pressure processing (HPP): equipment and commercial implementations. *Oral presentation on the 2014 International Nonthermal Processing Workshop*. The Ohio State University. Columbus, Ohio, EEUU.
- Tornberg, E., Olsson, A. & Perrson, K. (1997). Surface forces in emulsions. En: *Food Emulsions*. Tercera edición. Marcel Dekker, New York.
- Torres, J. & Velazquez, G. (2005). Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering*, 67(1), 95-112.
- Torrezan, R., Tham, W. P., Bell, A., Frazier, R. & Cristianini, M. (2007). Effects of high pressure on functional properties of soy protein. *Food Chemistry*, 80, 55–60.
- Traynham, T. L., Myers, D. J., Carriquiry, A. L. & Johnson, T. L. (2007). Evaluation of water-holding capacity of wheat-soy flour blends. *Journal of American Oil Chemist Society*, 84, 151-155.
- Tressl, R. & Drawertl, F. (1973). Biogenesis of banana volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21 (4), 560-565.
- Tsumura, K., Saito, T., Tsuge, K., Ashido, H., Kugimiya, W. & Inouye, K. (2005). Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. *Food Science and Technology*, 38(3), 255-261.
- Utsumi, S. (1992). Plant food protein engineering. En: *Advances in Food and Nutrition Research*. Academic Press, EEUU.

- Utsumi, S., Matsumura, Y. & Mori, T. (1997). Structure-function relationships of soy proteins. En *Food Proteins and their applications*. Marcel Dekker, New York.
- van Aken, G. A. (2002). Flow-induced coalescence in protein-stabilized highly concentrated emulsions. *Langmuir*, 18, 2549.
- van Aken, G. A., Blijdenstein, T. B. J. & Hotrum, N. E. (2003). Colloidal desestabilisation mechanisms in protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 8, 371-379.
- van Aken, G. A. (2004). 8- Coalescence mechanisms in protein-stabilized emulsions En: *Food Emulsions*. Cuarta edición. Marcel Dekker, New York.
- van Buren, J. P., Steinkraus, K. H., Hackler, L. R., El-Rawi, I. & Hand, D. B. (1964). Indices of protein quality of dried soymilk. *Agricultural and Food Chemistry*, 12, 524-528.
- van der Ven, C., Matser, A. M. & van den Berg, R. W. (2005). Inactivation of soybean trypsin inhibitors and lipoxygenase by high-pressure processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (4), 1087–1092.
- Vaudagna, S. R., Gonzalez, C. B., Bérengere, G., Aparicio, C., Otero, L. & Sanz, P. D. (2012). Effect of high hydrostatic pressure at subzero temperature on quality fo ready-to-eat cured beef carpaccio. *Meat Science*, 92, 575-581.
- Vrij A., Hesselink, F. T., Lucassen, J. & van den Tempel, M. (1970). Waves in thin liquid films. II. Symmetrical modes in very thin films and film ruptura. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen Series C Biological and Medical Sciences*, B73, 124.
- Wagner, J. R. & Añón, M. C. (1990). Influence of denaturation degree, hydrophobicity and sulfhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolates. *Journal of Food Science*, 50, 765-770.
- Wagner, J. R. (2000). Propiedades superficiales. En: *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. A.M.R. Pilosof & W. Bartholomai. Eudeba, Buenos Aires.
- Walstra, P. & De Roos, A. L. (1983). Proteins at air-water and oil-water interfaces: Static and dynamics aspects. *Food Reviews International*, 9, 503-525.
- Walstra, P. (1983). Formation of emulsion. En: *Encyclopedia of emulsion technology: Basic theory*. Volumen 3. Marcel Decker, New York.
- Walstra, P. (1993). Principles of emulsion formation. *Chemical Engineering Science*, 48, 333.

- Walstra, P. (1996a). 1- Emulsion stability, En: *Encyclopedia of Emulsion Technology*. Volumen 4. Marcel Dekker, New York.
- Walstra, P. (1996b). Disperse systems: Basic considerations. En: *Food Chemistry*. Tercera edición. Marcel Dekker, New York.
- Walstra, P. & Smulder, P. E. A. (1998). 2- Emulsion formation. En: *Modern Aspects of Emulsion Science*. The Royal Society of Chemistry, Reino Unido.
- Walstra, P. (2000). Sistemas dispersos: consideraciones básicas. En: *Química de los alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza.
- Walstra, P. (2003a). *Physical Chemistry of Foods*, Marcel Dekker, New York.
- Walstra, P. (2003b). Surface phenomena. En: *Physical Chemistry of Foods*. Marcel Dekker, New York.
- Wang, R., Zhou, X. & Chen, Z. (2008). High pressure inactivation of lipoxygenase in soy milk and crude soybean extract. *Food Chemistry*, 106 (2), 603–611.
- Welti-Chanes J., López-Malo A., Palou E, Bermúdez D., Guerrero-Beltrán J. & Barbosa-Cánovas G. (2005). Fundamentals and Applications of High Pressure Processing of Foods. En: *Novel Food Processing Technologies* 157-181. CRC Press, EEUU.
- Whitaker, J.R. (1972). Lipoxygenase. En: *Principles of enzymology for the food sciences*. Marcel Dekker, New York.
- Wilson, D. C. (1974). High pressure sterilization. Presented at 34<sup>th</sup> Annual Meeting, Institute of Food Technologists, New Orleans, Los Ángeles.
- Xiao, C. W. (2008). Health effects of soy protein and isoflavonas in human. *Journal of Nutrition*, 138 (6), 1244-1249.
- Xiao, C. W. (2011). 22 - Functional Soy Products. En: *Functional Foods*. Segunda edición. Woodhead Publishing Limited.
- Xu, S.Y., Shoemaker, C. F. & Luh, B. S. (1986). Effect of break temperature on rheological properties and microstructure of tomato juices and pastes. *Journal of Food Science*, 51, (2), 399–402.
- Yaldagard, M., Mortazavi, S. A. & Tabatabaie, F. (2008). The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects. *African Journal of Biotechnology*, 7 (16), 2739–2767.
- Yamasaki, M., Yasui, T. & Arima, K. (1964). Pectic enzymes in the clarification of apple juice. *Agronomical and Biological Chemistry*, 28, 779-787.

- Yamauchi, F., Yamagishi, T. & Iwabuchi, S. (1991). Molecular understanding of heat-induced phenomena of soybean protein. *Food Reviews International*, 7 (3), 283–322.
- Yazici, F., Alvarez, V. B., Mangino, M. E. & Hansen, P. M. T. (1997). Formulation and processing of a heat stable calcium-fortified soy milk. *Journal of Food Science*, 62 (3), 535–538.
- Ye, A. & Singh, H. (2001). Interfacial composition and stability of sodium caseinate emulsions as influenced by calcium ions. *Food Hydrocolloids*, 15 (2), 195–207.
- Ye, R. & Harte, F. (2014). High pressure homogenization to improve the stability of casein - hydroxypropyl cellulose aqueous systems. *Food Hydrocolloids*, 35, 670–677.
- Yuan, Y. J., Velev, O. D., Chen, K., Campbell, B. E., Kaler E. W. & Lenhoff, A. M. (2002). Effect of pH and Ca<sup>+2</sup>-induced associations of soybean proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4953-4958.
- Yuan, D. B., Yang, X. Q., Tang, C. H., Zheng, Z. X., Wei-Min, Ahmad, I. & Yin, S. W. (2009). Physicochemical and functional properties of acidic and basic polypeptides of soy glycinin. *Food Research International*, 42, 700-706.
- Zhang, H., Li, L., Tatsumi, E. & Kotwal, S. (2003). Influence of high pressure on conformational changes of soybean glycinin. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4 (3), 269–275.
- Zhang, H., Li, L., Tatsumi, E. & Isobe, S. (2005). High-pressure treatment effects on proteins in soy milk. *LWT - Food Science and Technology*, 38 (1), 7–14.