



RIDAA

Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Henao Ossa, Johan Sebastian

Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades interfaciales y emulsionantes de proteínas de sueros de soja y de tofu para la formulación de emulsiones alimentarias ácidas, estables en condiciones de estrés tecnológico



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.

Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Henao Ossa, J. S. (2021). *Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades interfaciales y emulsionantes de proteínas de sueros de soja y de tofu para la formulación de emulsiones alimentarias ácidas, estables en condiciones de estrés tecnológico. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2946>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades interfaciales y emulsionantes de proteínas de sueros de soja y de tofu para la formulación de emulsiones alimentarias ácidas, estables en condiciones de estrés tecnológico

TESIS DOCTORAL

Johan Sebastian Henao Ossa

jhenaoossa@uvq.edu.ar

Resumen

El suero de soja es un subproducto proveniente de la obtención de aislado proteico y el suero de tofu tiene origen en las operaciones de prensado o filtrado en la elaboración del tofu. Ambos subproductos poseen una cantidad sustancial de nutrientes y compuestos bioactivos como proteínas, azúcares simples, oligosacáridos, minerales e isoflavonas. Sin embargo, son eliminados como efluentes líquidos causando contaminación en los cursos de agua superficiales y subterráneos, cuando no son tratados previamente a su descarte. Por lo tanto, en base a lo descripto previamente, la recuperación y utilización de los sueros de soja y tofu o de algunos de sus componentes por diferentes estrategias es una alternativa prometedora para mitigar el impacto ambiental que genera la disposición final de estos líquidos residuales. Además, por el alto contenido de compuestos de interés y su bajo costo, se pueden emplear como materias primas para la preparación de ingredientes con potencial aplicación en la industria alimentaria. En el presente trabajo propone la obtención de emulsiones aceite en agua (O/W) preparadas con concentrados de suero de soja (CSS) y de tofu (CST) en el rango de pH de interés alimenticio con alta estabilidad frente a tratamientos de estrés tecnológico como la congelación y la agitación mecánica.

En el capítulo I se detalló la obtención de los concentrados de suero de tofu y se realizó la caracterización fisicoquímica del ST de partida, de los CST concentrados a diferentes temperaturas y los obtenidos a partir del ST con un proceso de neutralización previo a la etapa de concentración. Además, se evaluó las propiedades superficiales y espumantes. El incremento de temperatura, independientemente del pH inicial del suero (5,6 o 7,0), promovió el enriquecimiento de los concentrados en proteína bruta, cenizas y calcio, la glicosilación incipiente de proteínas y de péptidos, la pérdida de solubilidad de las proteínas

y al mismo tiempo, un incremento concomitante en la solubilidad del polisacárido. Además, se observó que las espumas formadas con el concentrado obtenido a mayor temperatura y sin neutralizar (80°C, CST80), fueron las más estables debido a la mayor presencia de partículas de proteínas agregadas que ingresan en la interfase aire/agua y la formación de una película interfacial con mayor viscoelasticidad.

En el capítulo II se evaluaron las propiedades emulsificantes en medio ácido de los concentrados del suero de tofu y la estabilidad de las emulsiones frente a tratamientos tecnológicos como la agitación mecánica y la congelación-descongelación. La mejor capacidad emulsificante de todos los concentrados se observó a pH 3,0, resultado que podría estar vinculado a la presencia de agregados de mayor tamaño que se adsorben en la interfase aceite/agua, disminuyendo la floculación por puenteo y re-coalescencia. Además, la estabilidad de las emulsiones frente a la congelación-descongelación y a la agitación mecánica fue altamente dependiente de las características de las emulsiones iniciales. Siendo relevante el tamaño de partícula inicial, el grado de floculación, la presencia de polisacáridos solubles en la fase acuosa no congelada y la mayor concentración de proteína interfacial que contribuye a la mayor viscoelasticidad de las membranas interfaciales.

En el capítulo III se detalló el proceso de obtención del SS y del concentrado de suero de soja (CSS). Se caracterizó el CSS en forma comparativa con el concentrado de suero de tofu obtenido a la misma temperatura (CST80). Se evaluó la composición química, las propiedades estructurales, el comportamiento superficial en la interfase aire/agua y las propiedades espumantes; en segundo lugar, se estudió el comportamiento interfacial en la interfase aceite/agua, las propiedades emulsificantes y la estabilidad de las emulsiones O/W frente a tratamientos tecnológicos. Finalmente, en la parte final del capítulo se estudió la formación de complejos entre el CSS y el polisacárido soluble de soja (SSPS), el empleo en la formulación de emulsiones O/W en medio ácido (pH 3,0) y la estabilidad de las mismas frente a tratamientos de estrés tecnológico. El CSS está compuesto principalmente por proteínas polisacáridos y sales, siendo pobre en calcio debido a la composición del suero de soja de partida. El CSS exhibió valores bajos de overrun en todo el rango de pH evaluado y una baja estabilidad de las espumas, en relación a los resultados obtenidos con CST80. La capacidad emulsificante para el CSS fue mayor a pH 3,0, relacionándose a los factores mencionados con las emulsiones obtenidas con lo CST, no obstante, el concentrado de suero de soja, no posee la capacidad de formar emulsiones finas y los sistemas fueron muy inestables frente a los procesos de congelación-descongelación y agitación mecánica. Por lo tanto, la preparación de emulsiones con CSS y SSPS en condiciones asociativas de complejación empleando diferentes estrategias, fue una alternativa eficaz para mejorar la capacidad emulsificante del CSS incrementar la estabilidad de las emulsiones CSS/SSPS frente al almacenamiento estacionario, la congelación-descongelación y la agitación mecánica.



Universidad
Nacional
de Quilmes



TESIS DOCTORAL

Ing. Johan Sebastian Henao Ossa

“Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades interfaciales
y emulsionantes de proteínas de sueros de soja y de tofu para la
formulación de emulsiones alimentarias ácidas, estables en condiciones
de estrés tecnológico.”

Director: Dr. Gonzalo Gastón Palazolo
Co-director: Dr. Jorge Ricardo Wagner



Universidad Nacional de Quilmes.
Departamento de Ciencia y Tecnología.
Doctorado en Ciencia y Tecnología.

TESIS DOCTORAL

“Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades interfaciales y emulsionantes de proteínas de sueros de soja y de tofu para la formulación de emulsiones alimentarias ácidas, estables en condiciones de estrés tecnológico.”

Ing. Johan Sebastian Henao Ossa.

Director:

Dr. Gonzalo Gastón Palazolo.

Co-director:

Dr. Jorge Ricardo Wagner.

Laboratorio de Investigación en Funcionalidad y Tecnología de Alimentos
(LIFTA).



Bernal-Argentina, marzo de 2021

*“Hay tres pautas básicas:
Tomarse en serio las cosas que uno hace,
dedicarse en cuerpo y alma a lograr el objetivo que uno se ha impuesto, y
convencerse de que lo importante en la vida es terminar lo que se empieza”*

Josef Ajram

*Dedicada con todo mi afecto a
mi círculo familiar
Claudia, Yanisse, Arnobe y Paola.
Gracias a su apoyo incondicional
he podido formarme.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a mi director, el Dr. Gonzalo Palazolo Por su valiosa contribución en mi formación académica, por su apoyo personal y profesional, por guiarme durante el trabajo experimental y su gran dedicación durante el análisis de resultados, escritura de este trabajo, su gran paciencia y sus precisos consejos en los momentos más indicados desde el inicio de este proceso.

Al Dr. Jorge Wagner quiero expresarle todo mi agradecimiento por depositar su confianza en mí y brindarme la oportunidad de iniciar mi formación doctoral. Su gran aporte y dedicación durante la parte experimental, análisis de resultados y escritura de esta tesis han hecho que esta pueda llegar a buen puerto. Además, quiero agradecerle por sus invaluable charla y consejos, los cuales me han servido para ser un mejor profesional y persona.

A mi familia por guiarme y apoyarme durante gran parte de mi vida. A Jenny le agradezco por ser mi compañera, mi polo a tierra y todo su afecto hacia mí el cual le es correspondido. Además, por su disposición ante cualquier requerimiento de mi parte.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por otorgarme las becas que permitieron realizar mi formación.

A la Universidad Nacional de Quilmes, por la formación académica que me proporciono. Y quiero dar un especial agradecimiento al personal del departamento de Ciencia y Tecnología por su disposición cuando requerí un espacio, material o equipo. Gracia Bruno y Néstor por sacarme una sonrisa cada día.

A mis compañero y amigos del LIFTA: Darío, Andres, Yeisson, Cecilia, Mariana, Paula y Anahí, por su valiosa amistad, compañerismo y apoyo en el día a día con consejos, charlas, mates o un café, lograron que este proceso sea un poco más llevadero.

A los integrantes del laboratorio LOMCEM: Mecha, Andrea, Orlando, Juan y Andres, les estoy enormemente agradecido por su colaboración cada que fue requerida. Quiero agradecer a vanessa y Alfon que siempre estuvieron dispuesta a colaborar y continuamente fueron personas muy atentas.

Finalmente quiero agradecer a todos mis amigos del departamento de Ciencia y Tecnología en especial a Evelyn, Claudia, Agustín, Fede, Mara y Matata, con los cuales compartimos muy buenos momentos.

Parte de los resultados presentados en este trabajo de Tesis doctoral fueron publicados en los siguientes medios:

Revistas periódicas

- Henao, J. S; Wagner, J.; Palazolo, Influence of chemical composition and structural properties on the surface behavior and foam properties of tofu-whey concentrates in acid medium. Food Research International.128 (2020).

Congresos nacionales e internacionales

- Henao, J.S; Wagner, J.; Palazolo, G. Estrategias de complejacion en medio ácido de concentrados proteicos de suero de soja y polisacáridos solubles de soja para la preparación de emulsiones O/W estables a la congelación/descongelación. Libro de resúmenes IX Simposio de Química aplicada y I Congreso Internacional de Nanoquímica, Nanofísica y Nano medicina (I CINNN)2019.
- Henao, J. S; Wagner, J.; Palazolo, G. Efecto de las condiciones de obtención de concentrados proteicos del suero de tofu sobre sus propiedades superficiales y espumantes a distintos pH. Libro de Resúmenes del VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos(CICYTA)2018.
- Henao, J. S; Wagner, J.; Palazolo, G. Emulsiones ácidas o/w preparadas con concentrados proteicos de suero de tofu y de soja. Análisis comparativo de la estabilidad frente a la agitación mecánica y la congelación. Libro de Resúmenes del VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos(CICYTA)2018.
- Henao, J.S.; Wagner, J.; Palazolo, G. Estudio comparativo de la estabilidad a la congelación/descongelación de emulsiones ácidas o/w preparadas con concentrados de suero de tofu y aislados proteicos del lacto suero. libro de resúmenes y trabajos del congreso latinoamericano de ingeniería y ciencias aplicadas (CLICAP)2018.
- Henao, J. S; Wagner, J.; Palazolo, G. Emulsiones ácidas aceite en agua preparadas con concentrados proteicos de suero de tofu. Estudio de la estabilidad frente al trabajo

mecánico. Libro de resúmenes y trabajos del congreso latinoamericano de ingeniería y ciencias aplicadas (CLICAP)2018.

- Henao, J. S; Wagner, J.; Palazolo, G. Efecto del pH sobre la solubilidad y propiedades superficiales de concentrados proteicos de suero de tofu. Libro de resúmenes y trabajos de XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos(CYTAL). Mar de la plata, Argentina, septiembre 18-20 de 2017.
- Henao, J. S; Wagner, J.; Palazolo, G. Influencia de las condiciones de obtención de concentrados proteicos de suero de Tofu sobre sus propiedades superficiales en medio ácido. Libro de resúmenes y trabajos de VII Conferencia internacional de Proteínas y Coloides Alimentarios (CIPCA). Buenos Aires, Argentina mayo 29-31.

Premios y distinciones

- Premio colectivo. Mención honorífica, mejor trabajo de investigación en la categoría de presentación oral, sesión Ciencia y Tecnología de Alimentos. Trabajo: Estrategias de complejación en medio ácido de concentrados proteicos del suero de soja para la preparación de emulsiones o/w estables a la congelación/descongelación. Henao Ossa, J.S, Wagner, J.R., Palazolo, G.G. IX Simposio de Química Aplicada y I Congreso Internacional de Nanoquímica, Nanofísica y Nanomedicina. Armenia, Colombia, 23 de agosto de 2019.

Contenido	Página
Introducción	1
I Generalidades de la soja	2
I.I Cultivo y usos	2
I.II Composición del grano de soja	3
I.III Proteínas de soja	4
I.IV Hidratos de carbono de soja	8
II Sueros de soja y tofu	10
II.II Obtención del suero de tofu.	11
III Polisacárido soluble de soja	13
IV Interacción entre biopolímeros	16
IV.I Interacción entre proteínas y polisacáridos	19
V Propiedades funcionales de proteínas.	21
V.I Propiedades de hidratación	22
V.II Propiedades de superficie	23
V.II.I Tensión superficial e interfacial	24
V.II.II Cinética de adsorción en la interfase	26
V.II.III Propiedades espumantes	28
V.II.III.I Formación de espumas	29
V.II.III.II Estabilidad de espumas.	31
V.II. IV Propiedades emulsionantes	32
V.II. IV.I Formación de emulsiones	34
V.II. IV.II Dispositivos de homogeneización	35
V.II. IV.III Agentes emulsificantes	37
V.II. IV.IV Emulsiones multicapa	38
V.II. IV.V Estabilidad de emulsiones	40
V.II. IV.VI Tratamientos de estrés tecnológico	44
VI Métodos de caracterización de sistemas dispersos.	47
VI.I Técnicas de dispersión de luz	47
VI.I.I Dispersión estática de luz (SLS)	47
VI.I.I.I Distribución de tamaño de partícula	48

VI.I.II	Dispersión dinámica de luz (DLS)	53
VI.I.III	Evaluación de la estabilidad global de una emulsión por medidas de dispersión múltiple de luz	54
VI.II	Determinación del potencial	56
VI.IV	Reología	58
VI.IV.I	Viscosidad de flujo estacionario	58
VI.IV.II	Reología Interfacial	61
VII	Objetivos	66
1,0	Caracterización fisicoquímica y evaluación de las propiedades superficiales y espumantes de los concentrados de suero de tofu	69
1.1	Materiales y Métodos	70
1.1.1	Materiales	70
1.1.2	Preparación de los concentrados de suero de tofu.	70
1.1.3	Determinación de densidad	71
1.1.4	Determinación de extracto seco	72
1.1.5	Determinación de cenizas	72
1.1.6	Determinación del contenido de calcio total	73
1.1.7	Determinación de nitrógeno total y proteína bruta	73
1.1.7.1.	Método de Kjeldahl	73
1.1.7.2.	Método de micro-Kjeldahl con colorimetría final	74
1.1.8	Determinación del contenido de carbohidratos totales	77
1.1.9	Determinación de fibra dietaria total	80
1.1.10	Determinación del contenido de lisina total y reactiva	80
1.1.10.1	Lisina total	80
1.1.10.2	Lisina reactiva	82
1.1.10.3	Lisina no reactiva	83
1.1.11	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con tricina (TSDS-PAGE)	83
1.1.11.1	Reactivos	84
1.1.11.2.	Preparación de los geles	84
1.1.11.3	Preparación de las muestras	85
1.1.11.4	Condiciones de corrida, coloración, revelado y análisis de los geles	85
1.1.12.	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (Fourier Transform	86

	Infrared Spectroscopy, FTIR)	
1.1.13	Análisis termogravimétrico (TGA).	86
1.1.14	Dependencia de la turbidez de las dispersiones con el pH	86
1.1.15	Dependencia del potencial-ζ con el pH	87
1.1.16	Dependencia de la solubilidad de proteínas e hidratos de carbono con el pH	88
1.1.17	Propiedades superficiales de los concentrados en interfase agua/aire	90
1.1.17.1	Determinación de la tensión superficial	90
1.1.17.2	Evaluación de la reología superficial	91
1.1.18	Evaluación de las propiedades espumantes	92
1.1.19	Análisis estadístico	93
1.2	Resultados y discusión	94
1.2.1	Composición química del suero de tofu	94
1.2.2	Composición, propiedades estructurales, superficiales y espumantes de concentrados obtenidos a partir suero de tofu sin ajuste previo de pH	95
1.2.2.1	Rendimiento de obtención y composición química	95
1.2.2.2	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con tricina (TSDS-PAGE)	98
1.2.2.3	Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier	99
1.2.2.4	Análisis termo-gravimétrico (TGA)	102
1.2.2.5	Dependencia de la turbidez y el potencial- ζ con el pH	105
1.2.2.6	Dependencia de la solubilidad acuosa de proteínas e hidratos de carbono con el pH	108
1.2.2.7	Evaluación del comportamiento superficial en la interfase agua/aire	111
1.2.2.8	Evaluación de las propiedades espumantes	114
1.2.3	Composición, propiedades estructurales, superficiales y espumantes de concentrados obtenidos a partir suero de tofu neutralizado	116
1.2.3.1	Rendimiento y composición química	117
1.2.3.2	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con tricina (TSDS-PAGE).	119
1.2.2.3	Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR).	120
1.2.3.4	Análisis termogravimétrico (TGA)	122
1.2.3.5	Dependencia de la turbidez y el potencial- ζ con el pH	125
1.2.3.6	Dependencia de la solubilidad de proteínas e hidratos de carbono con el pH	128

1.2.3.7	Evaluación del comportamiento superficial en interfase agua/aire	130
1.2.3.8	Evaluación de las propiedades espumantes	132
1.2.4	Conclusiones parciales	134
2.0	Propiedades emulsificantes de los concentrados del suero de tofu y estabilidad de las emulsiones o/w frente a tratamientos de estrés tecnológico	136
2.1	Materiales y métodos	137
2.1.1	Caracterización fisicoquímica de dispersiones de concentrado de suero de tofu	137
2.1.1.1	Distribución de tamaño de partícula por dispersión estática de luz (SLS, Static Light Scattering)	137
2.1.1.2	Tensión interfacial	138
2.1.1.3	Reología interfacial	138
2.1.2	Preparación de emulsiones O/W	139
2.1.3	Tratamientos de estrés tecnológico sobre las emulsiones O/W	140
2.1.3.1	Congelación /descongelación	140
2.1.3.2	Agitación mecánica controlada	140
2.1.4	Ensayos de caracterización de emulsiones	140
2.1.4.1	Distribución de tamaño de partícula	141
2.1.4.2	Comportamiento de flujo	141
2.1.4.3	Evaluación de la microestructura	142
2.1.4.4	Determinación del porcentaje de proteína adsorbida y la concentración interfacial de proteína	142
2.1.5	Análisis estadístico.	144
2.2	Resultados y discusión	145
2.2.1	Distribución de tamaño de partícula y comportamiento interfacial en la interfase agua/aceite de concentrados obtenidos a partir de suero de tofu sin ajuste de pH	145
2.2.1.1	Efecto del pH sobre la distribución de tamaño de partícula de las dispersiones acuosas.	145
2.2.1.2	Comportamiento interfacial de los concentrados de suero de tofu en interfase agua/aceite	148
2.2.2	Caracterización de emulsiones iniciales	152

2.2.2.1	Distribución de tamaño de partícula y microestructura	152
2.2.2.2	Porcentaje de proteína adsorbida y concentración de proteína interfacial	158
2.2.2.3	Comportamiento de flujo de las emulsiones	160
2.2.3	Evaluación de la estabilidad de las emulsiones frente a los tratamientos de estrés tecnológico	163
2.2.3.1	Congelación-descongelación	163
2.2.3.2	Agitación mecánica de emulsiones	167
2.2.3	Propiedades interfaciales y emulsificantes de los concentrados obtenidos a partir de suero de tofu neutralizado	171
2.2.3.1	Efecto del pH sobre el tamaño de partícula de las dispersiones acuosas	171
2.2.3.2	Comportamiento interfacial de los concentrados del suero de tofu neutralizado en interfase agua/aceite	174
2.2.3.3	Caracterización de emulsiones iniciales	177
2.2.3.3.1	Distribución de tamaño de partícula y microestructura	177
2.2.3.3.2	Porcentaje de proteína adsorbida y concentración de proteína interfacial.	181
2.2.3.3.3	Comportamiento de flujo	183
2.2.3.4	Evaluación de la estabilidad de las emulsiones frente a los tratamientos tecnológicos	185
2.2.3.4.1	Congelación-descongelación	185
2.2.3.4.2	Agitación mecánica	188
2.2.4	Conclusiones parciales	191
3.0	Caracterización fisicoquímica y evaluación de las propiedades superficiales, espumantes y emulsificantes del concentrado del suero de soja y su complejación con polisacárido soluble de soja para la elaboración de emulsiones o/w estables a tratamiento de estrés tecnológico	193
3.1	Materiales y métodos	194
3.1.1	Materiales	194
3.1.2	Preparación del suero de soja	195
3.1.3.	Preparación de los concentrados del suero de soja	195
3.1.4	Determinación de densidad	196
3.1.5	Determinación de extracto seco	196
3.1.6	Determinación de cenizas	196
3.1.7	Determinación del contenido de calcio total	196

3.1.8	Determinación de nitrógeno total y proteína bruta	197
3.1.8.1	Método de Kjeldahl	197
3.1.8.2	Método de micro-Kjeldahl con colorimetría final	197
3.1.9	Determinación del contenido de carbohidratos totales	198
3.1.10	Determinación de fibra dietaria total	199
3.1.11	Determinación del contenido de lisina total y reactiva	199
3.1.11.1	Lisina total	199
3.1.11.2	Lisina reactiva	199
3.1.11.3	Lisina no reactiva	200
3.1.12	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con tricina (TSDS-PAGE)	200
3.1.13	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)	201
3.1.14	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	201
3.1.15	Análisis termo gravimétrico (TGA)	201
3.1.16	Dependencia de la turbidez de las dispersiones con el pH	202
3.1.17	Dependencia del potencial-ζ con el pH	202
3.1.18	Dependencia de la solubilidad de proteínas e hidratos de carbono con el pH	202
3.1.19	Propiedades superficiales en interfase agua/aire	203
3.1.19.1	Determinación de la tensión superficial	203
3.1.19.2	Evaluación de la reología superficial	203
3.1.20	Evaluación de las propiedades espumantes	203
3.1.21	Caracterización fisicoquímica de dispersiones acuosas de concentrado de suero de soja para la preparación emulsiones o/w	204
3.1.21.1	Distribución de tamaño de partícula por dispersión estática de luz (SLS, Static Light Scattering)	204
3.1.21.2	Determinación de la tensión interfacial	204
3.1.21.4	Evaluación de la reología interfacial	205
3.1.22	Preparación de emulsiones o/w	205
3.1.23	Tratamiento de estrés tecnológico sobre las emulsiones o/w	206
3.1.23.1	Congelación/descongelación	206
3.1.23.2	Agitación mecánica controlada	206
3.1.24	Ensayos de caracterización de las emulsiones	206

3.1.24.1	Distribución de tamaño de partícula	206
3.1.24.2	Comportamiento de flujo	207
3.1.24.3	Evaluación de la microestructura	207
3.1.25	Caracterización fisicoquímica de dispersiones mixtas de concentrado de suero de soja (CSS) y polisacárido soluble de soja (SSPS) para la preparación de emulsiones o/w	208
3.1.25.1	Dependencia de la turbidez de las dispersiones con el pH	208
3.1.25.2	Distribución de tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz (DLS, Dynamic Light Scattering)	208
3.1.25.3	Determinación del potencial- ζ .	209
3.1.26	Evaluación de propiedades interfaciales en interfase aceite/agua	209
3.1.26.1	Determinación de la tensión interfacial	209
3.1.26.2	Evaluación de la reología interfacial	209
3.1.27	Preparación de emulsiones o/w a partir de dispersiones mixtas de concentrado de suero de soja y polisacárido soluble de soja	210
3.1.27.1	Complejacion en fase acuosa (CFA)	210
3.1.27.2	Complejación en interfase (CIF)	211
3.1.27.3	Complejacion en interfase con posterior sonicación (CIFS)	211
3.1.28	Tratamientos de estrés tecnológico sobre las emulsiones o/w	211
3.1.28.1	Congelación/descongelación	211
3.1.28.2	Agitación mecánica controlada	212
3.1.29	Ensayos de caracterización de las emulsiones	212
3.1.29.1	Distribución de tamaño de partícula	212
3.1.29.2	Comportamiento de flujo	212
3.1.29.3	Evaluación de la microestructura	212
3.1.29.4	Evaluación de la estabilidad global en condiciones estacionarias por dispersión múltiple de luz	213
3.1.30	Análisis estadístico	213
3.2	Resultados y discusión	214
3.2.1	Composición química del suero de soja.	214
3.2.2	Composición química, propiedades estructurales, superficiales y espumantes del concentrado obtenido a partir de suero de soja.	216

3.2.2.1	Rendimiento de obtención y composición química	216
3.2.2.2	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con tricina (TSDS-PAGE)	218
3.2.2.3	Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)	219
3.2.2.4	Análisis termo-gravimétrico (TGA)	222
3.2.2.5	Dependencia de la turbidez y el potencial- ζ con el pH	224
3.2.2.6	Dependencia de la solubilidad acuosa de proteínas e hidratos de carbono con el pH.	227
3.2.2.7	Evaluación del comportamiento superficial en la interfase agua/aire del concentrado proteico de suero de soja.	230
3.2.2.8	Evaluación de las propiedades espumantes del concentrado proteico de suero de soja	232
3.2.3	Propiedades emulsificantes de los concentrados del suero de soja y estabilidad de sus emulsiones o/w frente a tratamientos de estrés tecnológico	235
3.2.3.1	Distribución de tamaño de partícula y comportamiento interfacial en la interfase aceite/agua del concentrado obtenido a partir de suero de soja	235
3.2.3.2	Comportamiento interfacial del concentrado de suero de soja en interfase aceite/agua	237
3.2.3.3	Caracterización de emulsiones iniciales	241
3.2.3.3.1	Distribución de tamaño de partícula y microestructura	241
3.2.3.3.2	Porcentaje de proteína adsorbida y concentración de proteína interfacial	244
3.2.3.3.3	Comportamiento de flujo	245
3.2.3.4	Evaluación de la estabilidad de las emulsiones frente a los tratamientos tecnológicos	247
3.2.3.4.1	Congelación-descongelación	247
3.2.3.4.2	Agitación mecánica	250
3.2.4	Interacción entre concentrado proteico de suero de soja y polisacárido solubles de soja	253
3.2.4.1	Dependencia de la turbidez y el potencial- ζ con el pH	253
3.2.4.2	Tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz (DLS)	257
3.2.4.3	Comportamiento interfacial en interfase aceite/agua	260
3.2.4.4	Caracterización de las emulsiones iniciales	263
3.2.4.4.1	Distribución de tamaño de partícula y microestructura	263

3.2.4.4.2	Comportamiento de flujo	268
3.2.4.4.3	Estudio de estabilidad global de las emulsiones por dispersión múltiple de luz	270
3.2.4.5	Estabilidad de las emulsiones frente a los procesos de estrés tecnológico	276
3.2.4.5.1	Congelación-descongelación	276
3.2.4.5.2	Agitación mecánica	280
3.3	Conclusiones parciales.	283
4.0	Conclusiones	285
5.0	Referencias	290

LISTA DE ABREVIATURAS MÁS UTILIZADAS

Letras y abreviaturas griegas

ϕ	fracción volumétrica de fase dispersa
δ	densidad
ε	densidad de energía
τ	turbidez
Γ	concentración proteína interfacial
δ	densidad
ε	densidad de energía
η	viscosidad
η^*	viscosidad compleja
γ_i	tensión interfacial
γ_{eq}	tensión interfacial de equilibrio
γ_s	tensión superficial de equilibrio
π_i	presión interfacial
π_{eq}	presión interfacial de equilibrio
π_s	presión superficial de equilibrio
ϕ_m	fracción en masa de fase dispersa

Letras y abreviaturas latinas

% P/P	porcentaje peso en peso
% P/V	porcentaje peso en volumen
% V/V	porcentaje volumen en volumen
%P _A	Porcentaje de proteína adsorbida
ABS	absorbancia
APS	Aislado proteico de soja
BBTI	inhibidor de tripsina de Bowman Birk
BPM	Proteínas de bajo peso molecular
BS %	porcentaje de backscattering

CSS	Concentrado de suero de soja
CST	Concentrado de suero de tofu
D	diámetro de gota
DLS	Dynamic light scattering o dispersión dinámica de luz
DTP	Distribución de tamaño de partícula
D _{3,2}	diámetro promedio de Sauter
D _{4,3}	diámetro promedio de De Brouker
D _{4,3sonic}	diámetro promedio de De Brouker medido posterior a un proceso de sonicación
D _{4,3sonic}	diámetro promedio de De Brouker medido posterior a un proceso de sonicación
E _c	eficiencia de colisión
F _c	frecuencia de colisión
G′	Módulo de almacenamiento o elástico
G′′	Módulo de pérdida o viscoso
GF (%)	Grado de floculación
HC	Hidratos de carbono
HDS	Harina de soja
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
Hz	hertz
IR	Incremento relativo
K	Índice de consistencia
KDa	Kilo dalton
KTI	Inhibidor de la tripsina de Kunitz
L	lectina
Lis	Lisina
LNR	Lisina no reactiva
LR	Lisina reactiva
LT	Lisina total
mg/mL	miligramos por mililitro
mM	milimolar
mN/m	mili newton por metro
n	Índice de comportamiento de flujo

nm	nanómetros
O/W	aceite en agua (emulsión) o aceite/agua (interfase)
Pa	pascal
PM	Peso molecular
S _{HC}	Solubilidad hidratos de carbono
SLS	Dispersión estática de luz
S _p	Solubilidad proteica
SSPS	Polisacárido soluble de soja
STN	Suero de tofu neutralizado
tan δ	tangente del ángulo de desfase
TSI	Índice de estabilidad de Turbiscan
μm	Micrómetro
t _{1/2}	Tiempo medio de estabilidad de espumas
7s	β -Conglicinina
11s	Glicinina

INTRODUCCIÓN

I. Generalidades de la soja

I.I. Cultivo y usos

La soja (*Glycine Max L*) es una planta de ciclo anual, de la familia de las leguminosas, originaria del noreste de China y otras regiones de Asia, que ha sido cultivada hace más de 5000 años durante la estación cálida. Su adaptación a climas diversos y las pocas enfermedades que la atacan la convierten en una forma de cultivo muy rentable.

Esta planta herbácea posee vainas cortas, de alrededor de 10 cm de largo, de color verde o de color amarillo a marrón cuando está completamente madura y seca. Dichas vainas contienen en su interior entre uno y cuatro semillas o granos oleaginosos (con un 20% ^{P/p} de aceite), con distintas variaciones de color: amarillo o negro, aunque existen otras especies con semillas de color verde o castaño (Ridner, 2006).

La soja ha sido una de las principales fuentes de proteína en la dieta de las culturas orientales (Benedetti *et al.*, 2015), se le puede encontrar en una variedad de alimentos tradicionales no fermentados y fermentados: “leche de soja”¹ (soymilk), tofu, salsa de soja (shoyu), soja verde, germinados, miso, sufu (tofu fermentado), natto y tempeh (Belitz *et al.*, 2009). La mayor parte de la soja producida es molida para la obtención de aceite comestible y harinas y sólo una pequeña parte se procesa para la obtención de productos proteicos destinados a la alimentación humana (Jiménez, 2006). Debido a los potenciales efectos benéficos para la salud, en los últimos años se ha incrementado el consumo de alimentos a base de soja en los países occidentales; en este contexto, se han informado efectos hipocolesterolémicos, hipotensivos, anticarcinogénicos, antioxidantes e inmunomoduladores (Kwon *et al.*, 2002; Xiao, 2011).

Actualmente Argentina es el tercer productor a nivel mundial (detrás de Brasil y Estados Unidos) y el primero en utilizar las semillas de soja modificada genéticamente para la producción de aceite y harina desgrasada (Ridner, 2006; Rubinstein, 2004). El volumen de producción en la campaña 2018–2019 fue de 60,2 millones de toneladas, siendo el 80% de la producción nacional exportada principalmente en forma de grano entero, harina y aceite. El consumo interno de la harina de soja se destina fundamentalmente para la alimentación animal y un pequeño porcentaje para la elaboración de productos para el consumo humano. Además,

¹ La denominación “leche de soja” es aceptada en la legislación estadounidense y de algunos países del Mercosur como Uruguay, pero su uso no está permitido por el Código Alimentario Argentino para la denominación de venta del producto. No obstante, para fines prácticos, la denominación “leche de soja” se utilizará en este trabajo.

parte del aceite se emplea en la producción de biodiesel (MAGyP, 2019). En este contexto, la industrialización de la soja y el aprovechamiento de los subproductos generados representa una oportunidad para el desarrollo de nuevos ingredientes y productos que pueden abastecer el mercado interno y externo.

I.II. Composición del grano de soja

Las semillas de soja maduras presentan una forma casi esférica y están formadas por tres partes principales: la cáscara o tegumento, los cotiledones y el germen o hipocótilo, los cuales representan alrededor del 8, 90 y 2% del peso del grano, respectivamente. En la Tabla 1 se muestra la composición proximal de las distintas partes del grano.

Tabla 1: Composición porcentual del grano de soja entero y de las partes que lo componen (expresada en base seca). Fuentes: Badui (2015); Perkins (1995)

Componentes	Constituyentes de la semilla (% P/P)	Proteína (% P/P, N×6,25)	Lípidos (% P/P)	Cenizas (% P/P)	Carbohidratos (% P/P)
Grano entero	100	40,3	21,0	4,9	33,9
Cotiledones	90,3	42,8	22,8	5,0	29,4
Envolturas	7,3	8,8	1,0	4,3	85,9
Hipocótilo	2,4	40,8	11,4	4,4	43,4

La cáscara está compuesta por cuatro o cinco capas superpuestas de células de diferentes tipos. Los cotiledones son células alargadas que contienen cuerpos proteicos de 2–10 μm y aceite en forma de estructuras conocidas como oleosomas o esferosomas de 0,1–0,5 μm de diámetro, donde el aceite está rodeado de una membrana de fosfolípidos y proteínas llamadas oleosinas (Peng *et al.*, 2016). Los cuerpos proteicos contienen la mayor parte de las proteínas del grano de soja, denominadas proteínas de reserva. Las mismas se hidrolizan durante la germinación y sirven de sustrato para el crecimiento del embrión. Las proteínas

estructurales, enzimas e inhibidores enzimáticos se localizan en el resto de la célula (Cheftel, 1989; Badui, 2015).

I.III. Proteínas de soja

Las proteínas de soja se clasifican en base a su solubilidad a distintos pH, a las diferencias estructurales y a la función biológica. Los dos grandes grupos son las proteínas de reserva de los cuerpos proteicos y las proteínas biológicamente activas presentes en el citosol. Las proteínas de reserva representan el 80% de las proteínas totales del grano de soja, siendo las principales las globulinas, las cuales se clasifican en cuatro fracciones en función de su coeficiente de sedimentación. Estas fracciones son las 2S, 7S, 11S y 15S con un peso molecular (PM) aproximado de 25, 160, 350 y 600 kDa, respectivamente. Las globulinas 7S (β -conglucina) y 11S (glicina) representan aproximadamente un 70% del total de las globulinas. Presentan una alta solubilidad en agua a pH por encima de 7,0 y precipitan a pH $\approx$ 4,5, cerca de su punto isoelectrico (Perkins, 1995; Mojica *et al.*, 2014).

La glicina (11S) es un hexámero con un PM entre 300-380 kDa (Figura 1) y se forma al asociar seis polipéptidos ácidos y seis polipéptidos básicos (Staswick *et al.*, 1981). Posee una estructura cuaternaria compacta, la cual se estabiliza por puentes disulfuro, interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Los polipéptidos ácidos con un PM entre 31–38 kDa y los de naturaleza básica con un PM entre 18–20 kDa, están unidos por puentes disulfuro (Miroljub *et al.*, 2004; Mojica *et al.*, 2014). Se han identificado cinco subunidades: A1aB1b, A1aB2, A2B1a, A3B4, A5A4B3 clasificadas en dos grupos de acuerdo con la homología de secuencia de aminoácidos: grupo I (A1aB1b, A1aB2, A2B1a) y grupo II (A3B4, A5A4B3). Las subunidades del grupo I contienen dos residuos de cisteína, tres de cistina (–S–S–) y son ricas en metionina (cinco a ocho residuos); cada subunidad del grupo II tiene dos residuos de cisteína, dos de cistina y tres de metionina. Las subunidades de la glicina son polimórficas, es decir, entre distintos cultivos existen reemplazos aminoacídicos en el mismo tipo de subunidad (Fukushima, 2004).

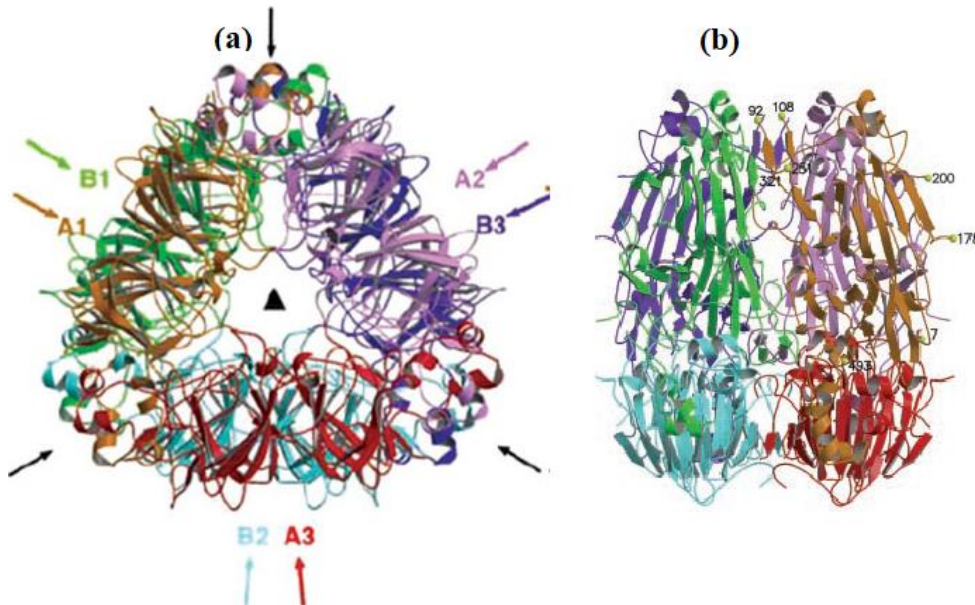


Figura 1: Estructura del homohexámero de la globulina 11S. Los seis protómeros de la glicinina hexamérica se presenta en: naranja (A1), rosa (A2), rojo (A3), Verde (B1), azul celeste (B2) y azul (B3). Las figuras (a) y (b) son vista de la molécula rotada entre si 90° (Adachi *et al.*, 2003).

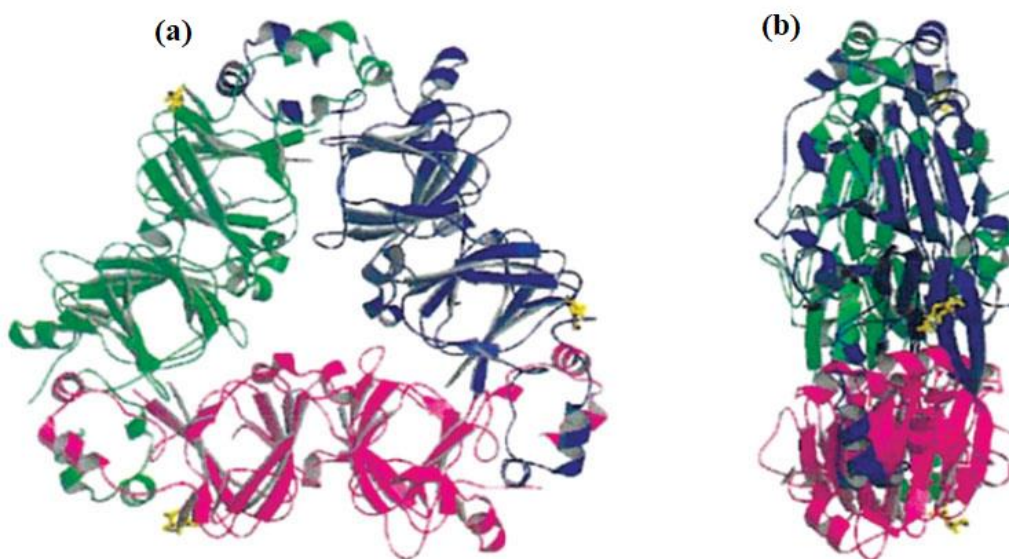


Figura 2: Estructura del trímero de la globulina 7S de soja (β -conglícinina). Los monómeros se presentan en rosado, verde y azul. Las posiciones glicosiladas se señalan en color amarillo. (a) y (b) son vistas de la molécula rotadas entre si 90° (Adachi *et al.*, 2003).

La β -conglícinina o globulina 7S posee un PM entre 150–200 kDa (Figura 2). Es una glicoproteína trimérica conformada por las subunidades α ($\approx$ 68 kDa), α' ($\approx$ 72 kDa) y β ($\approx$ 52kDa) (Thanh y Shibasaki 1976). Las subunidades α y α' contienen un residuo de cisteína

cerca del extremo N-terminal, mientras que la subunidad β carece de cisteína; ninguna de estas tres subunidades contiene residuos de cistina. Las subunidades se asocian mediante interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrogeno (Mojica *et al.*, 2014). El contenido de carbohidratos de la β -conglícinina varía entre 2,7 y 5,4%; la estructura de los residuos de oligosacáridos se conoce parcialmente y contienen fundamentalmente D-manosa y N-acetil D-glucosamina (Belitz *et al.*, 2009). La β -conglícinina puede aparecer al menos en siete formas o configuraciones, resultado de la combinación de las subunidades α , α' y β que interaccionan para producir los isómeros: $\alpha'\beta_2$, $\alpha\beta_2$, $\alpha\alpha'\beta$, $\alpha_2\beta$, $\alpha_2\alpha'$, α_3 y β_3 (Miroljub *et al.*, 2004; Fukushima, 2004).

Durante la preparación de aislados proteicos de soja (APS), en la etapa de la precipitación isoelectrica de las proteínas de reserva de la soja a pH $\approx$ 4,5, se genera como subproducto un suero conocido como suero de soja (SS), en el que permanecen solubles las proteínas biológicamente activas. Por tal motivo, a éstas también se las denominan proteínas del suero de soja. Estas proteínas están constituidas mayoritariamente por la lectina o hemaglutinina, los factores antitripticos de Kunitz (KTI) y de Bowman-Birk (BBTI) y enzimas como la lipoxigenasa, α -amilasa, citocromo C y ureasa (Sorgentini y Wagner, 1999). La lectina, el KTI y el BBTI son conocidos factores antinutricionales. La presencia de la forma activa de los factores antitripticos en la soja y productos derivados, especialmente el KTI, reduce la digestibilidad de las proteínas, la cual se suma a los efectos tóxicos de la lectina en el tracto gastrointestinal (Belitz *et al.*, 2009). Por ende, durante el proceso industrial de elaboración de los productos derivados de soja destinados a la alimentación animal y humana, se deben realizar tratamientos con el fin de inactivar los factores antinutricionales. Para la soja y otras leguminosas, se han propuesto varios tratamientos para la inactivación de los factores antitripticos, siendo los hidrotérmicos los más empleados (Avilés-Gaxiola *et al.*, 2018).

KTI es el más abundante de los factores antitripticos de soja con aproximadamente el 90% de la actividad inhibitoria (Young y Scrimshaw, 1979). Este polipéptido inhibe enzimas pancreáticas clave como la tripsina y la quimotripsina, tiene un PM de 20,1 kDa y una alta estabilidad en un amplio rango de pH (3 a 10), a temperaturas inferiores a 80 °C y en condiciones de baja humedad (Koshiyama *et al.*, 1981). Desde el punto de vista estructural, el KTI contiene dos residuos de cistina, que aunque no están localizados en el sitio activo, tienen un rol relevante en la estabilización de la estructura terciaria (Avilés-Gaxiola *et al.*, 2018). Además, el KTI inactivado puede contribuir a la producción de óxido nítrico por macrófagos e inhibe la proliferación de células cancerosas de mama e hígado (Lin y Ng, 2008). El BBTI es un polipéptido de 71 restos aminoacídicos, tiene un peso molecular de 8 kDa y posee una

estabilidad térmica significativamente superior a la del KTI, por lo que es responsable de la actividad antitriptica residual de los productos de soja (Sobral y Wagner, 2009). Está conformado por dos dominios definidos, uno para la inhibición de la tripsina y otro para la de quimotripsina. Este polipéptido pequeño contiene siete puentes disulfuro, que son responsables del mantenimiento de la estructura terciaria y la alta estabilidad térmica (Avilés-Gaxiola *et al.*, 2018; DiPietro y Liener, 1989). Se ha informado que el BBTI posee propiedades estimulantes de sistema inmunológico e inhibe la proliferación de células anticancerígenas (Kennedy, 1993).

Las lectinas son proteínas que interaccionan con azúcares (“*sugar-binding proteins*”) y están ampliamente distribuidas en el reino vegetal. También se llaman hemagglutininas debido a que tienen la capacidad de producir la aglomeración *in vitro* de eritrocitos. La mayor parte de las lectinas son glicoproteínas, la de soja tiene un PM de 122 kDa, está conformada por cuatro subunidades idénticas (30 kDa) y tiene un contenido de 4,5 % de D-manosa y 1,5% de N-acetil-D-glucosamina. El efecto tóxico de la lectina no se atribuye a la capacidad de aglutinación de eritrocitos sino en parte, a su resistencia a la proteólisis en el tracto digestivo. La unión de la lectina a las células epiteliales del intestino delgado y su posterior ingreso en el espacio intercelular produce un importante daño metabólico. Afortunadamente, la lectina de la soja se inactiva por tratamientos hidrotérmicos suaves: el calentamiento a 100 °C durante 10 min es suficiente para inhibir la acción de esta proteína (Belitz *et al.*, 2009; Turner y Liener, 1975).

Las lipoxigenasas (linoleato oxígeno reductasas; E.C. 1.13.11.12) son enzimas que catalizan la oxidación de ácidos grasos poli-insaturados que contienen la estructura 1,4 *cis-cis* pentadieno. Los productos finales de la oxidación son los hidroperóxidos, lo cuales se escinden en productos de menor peso molecular responsables de generar aromas y sabores indeseables en los productos elaborados a partir de la soja (Belitz *et al.*, 2009). Además, los hidroperóxidos y sus productos de descomposición son reactivos y pueden afectar otras moléculas, como las proteínas (Huang *et al.*, 2006). Las lipooxigenasas de la soja tienen un PM de 100 kDa, un punto isoelectrico de 5,7 y son inactivadas por tratamientos hidrotérmicos suaves (Iwabuchi y Yamauchi, 1987).

La ureasa (urea aminohidrolasa, E.C. 3.5.1.5) cataliza la hidrólisis de la urea, con formación de dos moles de NH₃ y un mol de CO₂ por mol de sustrato. Esta enzima es de interés tecnológico, debido a que su actividad sirve como indicador de la efectividad de los tratamientos térmicos de inactivación de los inhibidores de proteasas en el grano de soja, especialmente el KTI. La determinación de la actividad de la ureasa, mediante el índice de actividad ureásica (IAU), es común en productos de soja destinados a la alimentación animal,

como la harina. El procedimiento consiste en medir el incremento de pH de dispersiones acuosas de harinas y otros productos derivados, reguladas inicialmente a pH 7,0 luego de 30 min de incubación en condiciones estandarizadas (Araba y Dale, 1990; Sobral, 2015). El método de determinación del IAU es oficial de la AOCS (American Oil of Chemists' Society, Ba 9-58) y el Código Alimentario Argentino (Capítulo XIX, "Harinas, concentrados y derivados proteínicos", Artículo 1407) estipula valores máximos de IAU de 0,3 para harinas de soja.

I.IV. Hidratos de carbono de soja

Los hidratos de carbono de la soja se clasifican en solubles e insolubles, comprenden un 35% del grano entero y aproximadamente el 40 % de la materia seca de la harina desgrasada de soja (Tabla 2). Los carbohidratos solubles son mayoritariamente sacarosa, oligosacáridos (rafinosa, estaquiosa y verbascosa) y polisacáridos solubles, principalmente pectinas; estos dos últimos conforman la fibra dietaria soluble. Los carbohidratos insolubles son celulosa, hemicelulosa, lignina, pectinas insolubles y otros polisacáridos no digeribles, que constituyen la fibra dietaria insoluble de la soja (Ridner, 2006).

Los carbohidratos no estructurales, incluyen los azúcares de bajo peso molecular y una pequeña fracción de compuestos de carácter amiláceo. De hecho, el contenido de almidón en la harina de soja, a diferencia del de la harina de otras leguminosas (arvejas, lentejas), es muy bajo ($\approx 0,6 \% \text{ P/P}$, Belitz *et al.*, 2009). Los carbohidratos no estructurales se encuentran principalmente en el cotiledón del grano (Karr-Lilienthal *et al.*, 2005). La sacarosa es el disacárido principal en el grano de soja y los monosacáridos libres se encuentran en cantidades traza (Tabla 2). Los oligosacáridos presentes en la soja son no digeribles y se clasifican desde el punto de vista estructural como galacto-oligosacáridos (GOS), aunque algunos autores los han clasificado en forma separada como "oligosacáridos de soja" por ser derivados de la sacarosa (Mussatto & Mancilha, 2007). La rafinosa es un trisacárido donde un resto de D-galactosa se une al de D-glucosa de la sacarosa terminal por un enlace glicosídico $\alpha(1\rightarrow6)$ (Gal-Glu-Fru); en cambio, la estaquiosa ((Gal)₂-Glu-Fru) y la verbascosa ((Gal)₃-Glu-Fru), contienen dos y tres unidades de D-galactosa unidas a la sacarosa terminal a través de su residuo de D-glucosa. En la estaquiosa y la verbascosa, los restos de galactosa están también unidos entre sí por enlaces glicosídicos $\alpha(1\rightarrow6)$. Los oligosacáridos no son digeribles por las enzimas del tracto digestivo humano y la fermentación bacteriana a nivel intestinal genera en

algunas personas susceptibles calambres, náuseas, dolor abdominal y diarrea, siempre que el consumo sea excesivo. No obstante, en los últimos años, se ha reportado que el consumo moderado de estos oligosacáridos es sumamente beneficioso porque ejercen varios efectos positivos en la salud: acción prebiótica y crecimiento de bacterias benéficas en el colon, reducción del pH del colon con la consiguiente inhibición del crecimiento de algunas bacterias patógenas, de producción de sustancias citotóxicas y el incremento de la absorción de minerales. Además, se ha reportado que la proliferación de microorganismos benéficos favorece la producción de algunos nutrientes, en especial, algunas vitaminas del grupo B (Tomosatsu 1994; Liying *et al.*, 2003, Mussatto y Mancilha, 2007). Debido a estas propiedades benéficas, los oligosacáridos no digeribles se han incorporado como componentes de la fibra dietaria, de acuerdo con las definiciones más recientes propuestas por diferentes organizaciones internacionales gubernamentales y no gubernamentales (Gray, 2006).

Tabla 2: Composición promedio de hidratos de carbono en la harina de soja desengrasada y *pellets* de soja, expresado en base seca. Fuente: Karr-Lilienthal *et al.* (2005)

Hidratos de carbono no estructurales (17% P/P)	% P/P en base seca.	Hidratos de carbono estructurales (18–21% P/P)	% P/P en base seca.
Glucosa	Trazas	De cotiledón	
Galactosa	Trazas	Arabinogalactanos	5
Fructosa	Trazas	Polisacáridos ácidos tipo pectina	8–10
Sacarosa	6–8		
Rafinosa	5–7	De la cáscara Lignina, hemicelulosa y celulosa Galactomananos	1–2
Estaquiosa	4–5		
Verbascosa	Trazas		
Almidón	< 1		

Los polisacáridos estructurales están compuestos por celulosa, pectina y hemicelulosas, junto con mananos, galactanos y xiloglucanos. Parte de ellos están ubicados en el cotiledón y comprenden principalmente los polisacáridos ácidos, los cuales contienen 30% de residuos de ácido urónico (Furuta y Maeda, 1999; Nakamura *et al.*, 2004). Los polisacáridos neutros están

principalmente compuestos por arabinosa y galactosa (arabinogalactanos) y al igual que los polisacáridos ácidos, presentan una estructura ramificada (Nakamura *et al.*, 2006). La cáscara de soja, por su parte, es una fuente rica en fibra dietaria por lo cual la cáscara de soja está compuesta por un 86% P/p (en base seca), de carbohidratos que incluyen celulosa, hemicelulosa, polisacáridos tipo pectinas, xilano y galactomananos (Dust *et al.*, 2004).

Las fibras solubles e insolubles de la soja tienen efectos fisiológicos positivos en la salud del tracto gastrointestinal. Además, trabajos recientes han demostrado que muchos componentes aislados de la fibra son buenos agentes emulsificantes, estabilizantes y texturizantes (Nakamura *et al.*, 2006; Porfiri y Wagner 2018; Colletti *et al.*, 2019).

II. Sueros de soja y tofu

II.I. Obtención del suero de soja y usos

El suero de soja (SS) es un subproducto generado a partir de la producción de APS. Este subproducto posee una cantidad sustancial de nutrientes y compuestos bioactivos como proteínas, azúcares simples, oligosacáridos, minerales e isoflavonas (Belén *et al.*, 2013). El SS comúnmente se descarta en las aguas residuales, contaminando los cursos naturales de agua por su alto contenido de materia orgánica (Chua y Liu 2019). Para la obtención de los APS, se utiliza harina de soja desgrasada como material de partida, se realiza una extracción acuosa de las proteínas en medio alcalino débil (pH 8,0) y posteriormente una precipitación isoeléctrica de las proteínas de reserva (glicinina y β -conglucina) a pH 4,5, generándose un líquido remanente que contiene las proteínas que no precipitaron al pH mencionado. El conjunto de estas proteínas y los demás componentes hidrosolubles presentes constituyen el SS (Sorgentini y Wagner 1999; Liu *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014). Por cada tonelada de APS se generan aproximadamente 20 m³ de SS, que tiene no sólo una alta demanda biológica de oxígeno (DBO; 8000–9800 mg/L) sino también una elevada demanda química de oxígeno (DQO; 17.000–26.000 mg/L) (Belén *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). Por este motivo, es fundamental tratar el suero para reducir su carga orgánica antes de ser descartado como líquido residual. No obstante, estos tratamientos son costosos e incrementan el costo de producción de los APS (Wang *et al.*, 2013). Además de ser necesaria la gestión eficiente de este subproducto para minimizar el impacto sobre el medio ambiente, se debe evitar la pérdida de importantes compuestos bioactivos como las isoflavonas. En este contexto, el consumo de isoflavonas se ha

incrementado debido a la creciente cantidad de evidencias científicas acerca de los beneficios de su ingesta (Setchell *et al.* 2001; Liu *et al.*, 2013).

Debido a la elevada cantidad de componentes orgánicos y minerales, el SS sufre un rápido deterioro: tiene una vida aproximada de 24h dependiendo de las condiciones climatológicas y de almacenamiento. Por lo tanto, es necesario procesarlo rápidamente para diversos fines, como el aprovechamiento de las proteínas. En los últimos años se han realizado estudios para el aprovechamiento del SS; Zhang *et al.* (2014) emplearon un método de separación por columnas asociado a un tamiz vertical para la recuperación de las proteínas del suero. Por otro lado, Li *et al.* (2016) mejoraron el método descrito previamente, evitando la agregación irreversible de las proteínas por adición de un antiespumante con un contenido de 25% de Tween 20. Liu *et al.* (2013) desarrollaron un método de fraccionamiento de espuma en dos etapas empleando proteínas del SS como colectores para la obtención de isoflavonas. Otros investigadores, por medio de una concentración por congelación y empleando un intercambiador de calor de película descendente, lograron aumentar el contenido de sólidos solubles en el suero tratado, facilitando la recuperación de éstos (Belén *et al.*, 2012,2013). Además, el SS deshidratado por liofilización o secado en estufa a presión reducida se ha empleado como agente emulsificante, obteniéndose excelentes resultados (Sobral *et al.*, 2018). Las proteínas aisladas del SS, usando el método tradicional de precipitación con sulfato de amonio (Sorgentini y Wagner, 1999), han mostrado buenas propiedades emulsificantes en sistemas modelo a pH 7,0, en especial cuando están completamente desnaturalizadas (Palazolo *et al.*, 2004, 2005). Finalmente, la interacción de las mismas con polisacárido soluble de soja en medio ácido (pH 3,0), incrementaron notablemente la estabilidad de las emulsiones resultantes frente al almacenamiento estacionario (Ray y Rousseau, 2013).

Por lo tanto, en base a lo descrito previamente, la recuperación y utilización del SS o de algunos de sus componentes por diferentes estrategias es una alternativa prometedora para mitigar el impacto ambiental que genera la disposición final de este líquido residual. Además, por el alto contenido de compuestos de interés y su bajo costo, se puede emplear como materia prima para la preparación de ingredientes con potencial aplicación en la industria alimentaria.

II.II. Obtención del suero de tofu

El tofu es el principal producto procesado de soja y es popular en Asia, particularmente en los países de Asia oriental y sudoriental. Además, es cada vez más aceptado por los consumidores europeos debido a los beneficios para la salud y su aceptable precio (Chua y Liu,

2019). El proceso típico de obtención del tofu se inicia con la limpieza y remojo de los granos de soja durante 8 a 10 h; seguidamente se realiza una etapa de molienda y extracción húmeda con una corriente de agua entre 80 a 90 °C. Este tratamiento térmico inactiva la lipoxigenasa y promueve la formación de un sistema disperso complejo (pH ~ 6,5) llamado leche de soja (*soymilk*), donde al menos 50% de las proteínas están presentes en partículas de diámetro mayor a 40 nm. Los lípidos, por su parte, se encuentran dispersos en cuerpos oleosos (*oil bodies*), rodeados por fosfolípidos y oleosinas (Peng *et al.*, 2016). Luego se realiza una etapa de cocción con el objetivo de eliminar compuestos volátiles e inactivar los factores antitripticos (Liu, 1999). El filtrado posterior de la leche de soja permite la eliminación de fibras y proteínas insolubles asociadas y en la fracción soluble, las proteínas de reserva se coagulan añadiendo sales de calcio y magnesio (2–4 % de peso original de leche de soja, entre 10–30 min, a 70–85 °C) o alternativamente agentes acidulantes como la D-glucono δ -lactona (GDL) y el ácido cítrico (Khoder *et al.*, 2020; Peng *et al.*, 2016). Como resultado de la coagulación, se forma una estructura tipo gel llamada tofu, constituida fundamentalmente por las proteínas de reserva, fibras y lípidos; el suero de tofu (ST) es expulsado en las operaciones de prensado o filtrado (Belén *et al.*, 2012). Aunque el ST contiene proteínas, oligosacáridos, sales e isoflavonas, que pueden aislarse y emplearse como ingredientes en productos alimentarios, actualmente es eliminado como un efluente líquido, causando contaminación en los cursos de agua superficiales y subterráneos, cuando no son tratados previamente a su descarte (Sobral y Wagner, 2009; Palazolo *et al.*, 2013). Al igual que el SS, el ST tiene una alta demanda química de oxígeno (DQO: 17,000–26,000 mg/L). Además, por cada kg de grano de soja empleado para la producción de tofu, se generan 9 kg de ST, los cuales representan un importante problema ambiental (Fei *et al.*, 2017).

Las proteínas del suero de tofu, a diferencia de las del SS, están desnaturalizadas debido a los tratamientos térmicos aplicados a la leche de soja. La sacarosa es el azúcar más abundante en el ST, seguidos por los oligosacáridos estaquiosa y rafinosa (Espinosa-Martos y Rupérez, 2006). El ST contiene alrededor del 9% de las proteínas de la soja y cerca del 70% de los minerales agregados en la coagulación (Ben Ounis *et al.*, 2008). Con respecto a la composición polipeptídica del ST, evaluada por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), se ha informado la presencia de KTI, de subunidades de la β -conglucina, de subunidades de la lectina y una fracción de polipéptidos de bajo peso molecular (BPM ~ 14 kDa) (Espinosa-Martos y Rupérez, 2006; Sobral, 2015). Además, por experimentos de SDS-PAGE con tricina (TSDS-PAGE), se observó que la composición

polipeptídica del ST depende del tipo y concentración de sales de calcio utilizadas como coagulantes, observándose la mayor variación en las subunidades de la β -conglucina (Kao *et al.*, 2003).

En los últimos años, varios investigadores han valorizado el ST proponiendo alternativas para su tratamiento por métodos físicos (recuperación de nutrientes) y microbiológicos/enzimáticos (biotransformación). Bazinet *et al.*, (1999) recuperaron magnesio (65% de recuperación) y proteínas (34,7% de recuperación) del ST con un método combinado de electrodiálisis y electroacidificación de membrana bipolar. El magnesio recuperado puede ser reutilizado en la etapa de coagulación y, por ende, disminuye la necesidad del uso de coagulantes frescos. Las proteínas y los oligosacáridos se pueden extraer del ST mediante ultrafiltración con membranas de diferentes cortes de peso molecular (Srinivorn *et al.*, 2015). Por otro lado, el ST ha sido concentrado por congelación en un equipo de película descendente para recuperar proteínas e isoflavonas. (Belén *et al.*, 2012; Belén *et al.*, 2013; Benedetti *et al.*, 2015). Finalmente, los ST deshidratados por liofilización o por secado en estufa a presión reducida mostraron excelentes propiedades emulsificantes en sistemas modelo a pH 7,0. De hecho, la estabilidad de las emulsiones a concentración equivalente de proteína fue mayor que la de los SS deshidratados (Sobral *et al.*, 2018). En otros estudios realizados en emulsiones preparadas con APS, el ST deshidratado por liofilización mostró un efecto crioprotector superior al de la sacarosa a concentración equivalente de hidratos de carbono y en largos períodos de almacenamiento congelado (1–6 meses) (Palazolo *et al.*, 2013).

III. Polisacárido soluble de soja

El polisacárido soluble de soja (SSPS) es un polisacárido presente en el cotiledón del grano y se extrae a partir del okara. El okara es el residuo insoluble rico en fibra, resultante de la preparación de APS y la leche de soja y se separa de la dispersión acuosa de las proteínas por filtración o centrifugación. La extracción de los polisacáridos a partir del okara se realiza por tratamiento térmico en un medio débilmente ácido. Luego del procedimiento de extracción, se realiza un refinamiento, pasteurización y finalmente un secado por *spray* o aspersión. La técnica de extracción ha sido patentada (Fuji Oil Co, Japón) y por leves modificaciones experimentales se obtienen distintas variantes de SSPS que difieren en sus propiedades físicas y comportamiento tecnofuncional (Maeda y Nakamura 2009).

En la Tabla 3 se observa la composición proximal típica del SSPS. El análisis de los monosacáridos constituyentes revela que la D-galactosa, L-arabinosa y ácido D-galacturónico son los azúcares principales, pero también están presentes otros azúcares como L-ramnosa, D-fucosa, D-xilosa y D-glucosa (Furuta *et al.*, 1998). La composición del SSPS es similar a la de las pectinas ácidas de las frutas (manzanas, cítricos), aunque con un contenido significativamente mayor de monosacáridos neutros. Además, tiene un contenido de proteína residual variable (entre 5,0 y 10,0% P/P , Furuta *et al.*, 1998; Maeda y Nakamura 2009); no obstante, se ha demostrado que la composición química del SSPS depende principalmente del proceso de extracción. Por cromatografía de filtración en gel, se han separado tres componentes con PM de 550 kDa, 25 kDa y 5 kDa, respectivamente. La estructura química del componente principal del SSPS (550 kDa) es muy compleja. La cadena principal está conformada por unidades de homogalacturano y ramnogalacturano. El homogalacturano está conformado por restos de ácido D-galacturónico (D-GalA) unidos por enlaces glicosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$. El ramnogalacturano está constituido por restos de D-GalA y L-ramnosa (L-Ra) unidos por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ y $\alpha(1\rightarrow2)$. Las ramificaciones del componente principal del SSPS están ligadas a la cadena principal a través del C4 de los residuos de L-Ra de los ramnogalacturanos: son unidades de β -1,4-homogalactano (residuos de D-galactosa unidos por enlaces glicosídicos β -1,4), α -1,3-homoarabinano y α -1,5-homoarabinano (residuos de L-arabinosa unidos por enlaces glicosídicos $\alpha(1\rightarrow3)$ y $\alpha(1\rightarrow5)$, respectivamente). A su vez, los residuos de L-arabinosa, D-fucosa, D-glucosa y D-xilosa pueden ligarse a las unidades β -1,4-homogalactano (Madamera *et al.*, 2001; Maeda y Nakamura, 2009)

Tabla 3: Composición química del polisacárido soluble de soja (SSPS, SOYAFIBE-S-DA100®). En la composición de azúcares del SSPS, el % P/P se expresa sobre azúcares totales. Ra: L-ramnosa; Fu: D-fucosa; Ara: L-arabinosa, Xi: D-xilosa; Gal: D-galactosa; Glc: D-glucosa; Gal A: ácido D-galacturónico. Fuente: Maeda y Nakamura (2009).

Humedad (% P/P)	Proteína bruta (% P/P)	Cenizas (% P/P)	Fibra dietaria (% P/P)	Composición de azúcares (% P/P)						
				Ra	Fu	Ara	Xi	Gal	Glc	Gal A
5,8	9,2	8,6	66,2	5,0	3,2	22,6	3,7	46,1	1,2	18,2

El SSPS es un polisacárido no gelificante, es soluble en agua fría y caliente y forma soluciones de baja viscosidad en comparación con otros hidrocoloides, como la goma guar. Además, la viscosidad de las soluciones de SSPS no es significativamente afectada por el agregado de ácidos y sales, disminuyendo sólo en forma leve con el calentamiento (Maeda y Nakamura, 2009). Además, el SSPS es un polisacárido con actividad superficial. Se ha demostrado que este polisacárido tiene excelentes propiedades emulsificantes y estabilizantes de emulsiones aceite en agua en un amplio rango de pH, formando películas interfaciales resistentes (Furuta *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2006a; Porfiri *et al.*, 2016) en concentraciones menores que las reportadas para otros polisacáridos como la goma arábica y almidones modificados (Buffo *et al.*, 2001). Se ha demostrado que la fracción de proteína asociada al SSPS juega un papel importante en el anclaje de la fracciones de carbohidratos en la interfase aceite/agua (Nakamura *et al.*, 2004b). Cuando el SSPS se utiliza como único agente emulsificante, estabiliza las gotas de aceite por un mecanismo de repulsión estérica, con las largas cadenas de polisacáridos de naturaleza hidrofílica formando películas interfaciales gruesas (aproximadamente 30 nm) e hidratadas que evitan la floculación y coalescencia de las gotas (Nakamura, *et al.*, 2004).

El SSPS también ha sido empleado para la elaboración de películas biodegradables, dado que este biopolímero es un polisacárido con fuertes propiedades adhesivas, incluso mayores que las reportadas para goma arábica y pululano (un polisacárido con una fuerza adhesiva muy alta) (Maeda y Nakamura, 2009; Salarbashi *et al.*, 2019).

Finalmente, el SSPS también se ha empleado junto con distintas proteínas para la formulación de emulsiones aceite en agua en medio ácido, logrando un incremento de la estabilidad en condiciones estacionarias de almacenamiento y frente a tratamientos tecnológicos. Como se mencionó anteriormente (sección II.I), Ray y Rousseau (2013) formularon emulsiones con dispersiones mixtas de proteínas aisladas del SS y SSPS a pH 3,0, logrando una estabilización durante el almacenamiento estacionario por 60 días. Además, (Tran y Rousseau, 2013) encontraron que la interacción entre el SSPS y las proteínas del APS promueve la estabilización de emulsiones a valores de pH cercanos al punto isoelectrico de la glicinina y la β -conglucina y por ende, permite extender el rango de aplicación de estas proteínas en sistemas dispersos ácidos. De la misma manera, el SSPS se ha empleado para la estabilización de emulsiones de base láctea en medio ácido por interacción con las caseínas, logrando excelentes resultados, debido también a su baja reactividad con el calcio y su bajo impacto sobre la viscosidad (Maeda y Nakamura, 2009). Finalmente, Cabezas *et al.*, (2019) realizaron estudios sobre emulsiones preparadas con dispersiones mixtas de SSPS y aislado

proteico del lactosuero (WPI) en medio ácido (pH 3,0), logrando una mayor estabilidad a la congelación-descongelación con respecto a la de las emulsiones preparadas sólo con WPI. En base a lo mencionado, el SSPS es una excelente alternativa para ser empleado junto con proteínas en la formulación de emulsiones y para obtener sistemas estables frente a tratamientos de estrés tecnológico.

IV. Interacción entre biopolímeros

Según la naturaleza y las condiciones del medio en que se encuentren los biopolímeros, pueden existir entre ellos interacciones sinérgicas o antagónicas, las cuales generan cambios en sus propiedades funcionales (Kruif *et al.*, 2004). Las principales interacciones entre moléculas de proteínas con otros biopolímeros, como los polisacáridos son:

(i). Covalentes: Enlaces formados entre átomos de los grupos funcionales en la misma macromolécula o en diferentes macromoléculas. La unión se establece mediante la coparticipación de electrones entre los átomos que se combinan o, alternativamente, cuando uno de los átomos participantes aporta el par de electrones para la formación del enlace. Además, se pueden formar enlaces covalentes dobles o triples, que tienden a ser más cortos y fuertes que los enlaces simples; la presencia de éstos le otorga rigidez estructural al grupo funcional. La distribución de los electrones dentro de un enlace covalente determina su polaridad. Cuando los electrones están igualmente compartidos por los átomos el enlace es no polar; en caso contrario, será polar y uno de los átomos adquirirá una carga parcial positiva (δ^+) y el otro, negativa (δ^-). Los enlaces covalentes también poseen direccionalidad, es decir, la tendencia a estar localizados en ángulos claramente definidos con respecto a otros. Las propiedades mencionadas determinan la estructura tridimensional, la flexibilidad estructural, la reactividad química y las demás interacciones que se establecen entre los grupos funcionales de las macromoléculas (McClements, 2016).

(ii). Electrostáticas: Las interacciones electrostáticas se establecen entre grupos ionizados, que poseen una carga eléctrica permanente o entre moléculas neutras con un momento dipolar permanente, donde las cargas parciales (δ^+ y δ^-) están asimétricamente distribuidas. Las interacciones electrostáticas más importantes son las interacciones ión-ión, ión-dipolo y dipolo-dipolo. Estas interacciones son de carácter repulsivo o atractivo dependiendo si las cargas (o

cargas parciales) de los grupos funcionales involucrados tienen signo igual u opuesto. La intensidad de las interacciones electrostáticas se reduce con el aumento de la fuerza iónica por apantallamiento (“*electrostatic screening*”) y, por ende, son fuertemente afectadas por la presencia de sales. Además, las interacciones son afectadas por el pH de acuerdo con el pK_a de los grupos funcionales involucrados (McClements, 2016). En las proteínas y polisacáridos, la interacción por puentes iónicos involucra la interacción electrostática atractiva de cationes polivalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+}) con diferentes grupos aniónicos de las macromoléculas, lo cual puede producir cambios drásticos en la solubilidad. Por ejemplo, el agregado de Ca^{2+} a la leche de soja en medio neutro o débilmente ácido ($pH \sim 6,5$), favorece la coagulación de las proteínas de reserva por la formación de puentes iónicos que involucran los restos aminoacídicos de glutamato y aspartato, lo que permite la obtención del tofu (sección II.II) (Peng *et al.*, 2016).

iii) Puentes de hidrógeno: Es una interacción dipolo-dipolo que se establece no sólo entre grupos funcionales de las macromoléculas, sino también entre estos grupos y las moléculas de agua. Los puentes de hidrógeno se forman cuando un par de electrones no compartido de un átomo muy electronegativo como el oxígeno interacciona con un átomo de hidrógeno de un grupo funcional vecino ($O-H^{\delta+} \cdots ^{\delta-}O$). Estas interacciones son más fuertes que otras del tipo dipolo-dipolo debido a que los átomos de hidrógeno tienen un radio pequeño y una alta tendencia a adquirir una carga parcial positiva (δ^+). De hecho, la intensidad de esta interacción produce un alineamiento permanente de los grupos funcionales involucrados. Este carácter direccional del puente de hidrógeno explica en parte, las propiedades únicas de la molécula de agua.

(iv). Van der Waals: Las fuerzas de van der Waals son interacciones de carácter atractivo que actúan en todos los tipos de grupos funcionales (iónicos y neutros, polares y no polares) (Israelachvili, 2011). Las interacciones de Van der Waals tienen tres contribuciones principales: inducción, dispersión y orientación. En una molécula o grupo funcional no polar, los electrones se mueven continuamente alrededor del núcleo y de manera instantánea, se puede generar una distribución asimétrica de las cargas negativas, creando un dipolo transitorio. Las fuerzas de dispersión, también llamadas fuerzas de dispersión de London, surgen cuando un dipolo transitorio en un grupo funcional no polar genera un campo eléctrico que induce un dipolo instantáneo en otro grupo vecino (Dickinson, 1998; McClements, 2006).

Las fuerzas de inducción surgen cuando un dipolo permanente en un grupo genera un campo eléctrico que induce un dipolo transitorio en otro grupo funcional. Finalmente, las fuerzas de orientación surgen entre dos dipolos permanentes que rotan continuamente. Cuando la interacción entre los dos dipolos es lo suficientemente fuerte como para que los mismos estén alineados permanentemente en el tiempo, esta contribución es reemplazada por la interacción dipolo-dipolo descrita en el ítem *ii*) (McClements, 2016).

(v). Exclusión estérica: Cuando los átomos de dos grupos funcionales se acercan lo suficiente como para producir un solapamiento de sus capas electrónicas, se genera una fuerte interacción repulsiva, pero de corto alcance. Esta interacción recibe el nombre de fuerza de exclusión estérica o de solapamiento estérico. En mezclas de biopolímeros, el gran volumen ocupado por una molécula de biopolímero en solución disminuye el volumen disponible que puede ser ocupado por la molécula de otro biopolímero debido al efecto estérico; por ende, el contacto entre ambas moléculas no es favorable termodinámicamente debido a una disminución en la entropía y se genera una fuerte interacción repulsiva (McClements, 2016).

(vi). Hidrofóbicas: Son interacciones atractivas moderadamente fuertes que se establecen entre los grupos no polares presentes en las macromoléculas y en presencia de agua (McClements, 2016). El origen de estas interacciones se atribuye a la capacidad de las moléculas de agua de formar puentes de hidrógeno relativamente fuertes con sus vecinas en tanto que con los grupos no polares es sólo posible la interacción por fuerzas de dispersión más débiles. Cuando un grupo no polar se pone en contacto con agua, las moléculas de agua se reordenan en su inmediata vecindad formando puentes de hidrógeno. Por lo tanto, para que dos grupos no polares interactúen entre sí en presencia de agua, es necesaria la ruptura de los puentes de hidrógeno de las moléculas de agua organizadas en sus vecindades, fenómeno termodinámicamente favorecido debido a un incremento de la entropía del sistema. Este fenómeno se denomina efecto hidrofóbico y es responsable de la inmiscibilidad del aceite con el agua y en el caso de las proteínas, es responsable de los fenómenos de agregación por desnaturalización térmica y la adsorción interfacial (sección V.II). Además, la intensidad de las interacciones hidrofóbicas se incrementa con el aumento moderado de la temperatura (Gálvez Mariscal *et al.*, 2013).

La intensidad de las interacciones mencionadas depende de los tipos de biopolímeros involucrados (peso molecular, densidad de carga, flexibilidad estructural, hidrofobicidad), la composición de la solución (pH y fuerza iónica) y las condiciones del entorno (temperatura y

cizallamiento). El control de estos parámetros en los sistemas dispersos permite modular la intensidad de las interacciones entre los biopolímeros (McClements, 2006)

IV.I. Interacción entre proteínas y polisacáridos

Las interacciones entre proteínas y polisacáridos, son empleadas ampliamente para mejorar la estabilidad física y las características de textura de una amplia gama de sistemas coloidales dispersos (dispersiones, emulsiones, espumas, geles y sus variantes) y de diversos alimentos procesados (Semenova, 2017). La interacción con polisacáridos puede modificar la solubilidad, las propiedades espumantes, gelificantes y emulsificantes de las proteínas. Las interacciones dependen del estado conformacional del biopolímero (globular, estructuras desordenadas, “*random coil*”, estructuras helicoidales en polisacáridos, etc.), tamaño molecular, pH, fuerza iónica, densidad de carga, temperatura y concentración: (i) interacciones no covalentes: electrostáticas, puentes de hidrógeno, hidrófobas, Van der Waals, exclusión estérica y (ii) enlaces covalentes (McClements 2016; Ozturk y McClements 2016; Semenova 2017).

Al preparar sistemas mixtos de proteínas y polisacáridos se pueden generar sistemas con una sola fase o bifásicos, lo cual depende en gran medida en la naturaleza de los biopolímeros involucrados, la composición de la dispersión acuosa y las condiciones del entorno (Figura 3). En sistemas de una fase, ambos biopolímeros pueden coexistir como moléculas individuales o como complejos solubles que se distribuyen uniformemente por todo el sistema (sistemas *a* y *d*). En los sistemas bifásicos, la interacción entre los dos biopolímeros y la separación de las fases puede ocurrir por dos mecanismos fisicoquímicos: asociativo, donde ambos biopolímeros se atraen entre sí (sistema *b*) y segregativo, donde los dos biopolímeros se repelen, definiéndose como incompatibles (sistema *c*) (Benichout *et al.*, 2002; de Kruif y Tuinier 2001; McClements, 2006; Rodríguez Patino y Pilosof, 2011).

En dispersiones diluidas el sistema mixto es estable debido al efecto predominante de la entropía de mezclado; las proteínas y polisacáridos forman complejos solubles (sistema *a*) o son cosolubles (sistema *d*). Al incrementar la concentración de los biopolímeros pueden ocurrir los fenómenos de asociación o segregación (sistemas *b* y *c*, respectivamente). En la separación asociativa existen fuertes atracciones entre los biopolímeros debido a la atracción electrostática. Por ejemplo, la complejación entre proteínas y polisacáridos aniónicos ocurre a un valor de pH menor al punto isoeléctrico de las proteínas. Al incrementar la concentración de biopolímeros ocurre una separación de fases donde se genera una fase coacervada rica en

biopolímeros y otra fase diluida con baja concentración de ambos biopolímeros, un fenómeno denominado coacervación compleja. La formación de estos complejos es usualmente reversible, lo cual se logra modificando las condiciones del entorno (de Kruif *et al.*, 2004). En sistemas donde predominan las interacciones de repulsión entre los biopolímeros al incrementar la concentración ocurre una separación de fases en la cual cada biopolímero se encuentra concentrado en una fase independiente. Este fenómeno se denomina segregación y a estos sistemas se los han denominado “emulsiones agua en agua (W/W)” (Martínez, 2010). La segregación puede darse entre un polisacárido aniónico y una proteína a un pH mayor a su punto isoelectrico, donde ambos biopolímeros exhiben carga neta negativa. En este contexto, en la Figura 3 se hizo especial énfasis en las interacciones electrostáticas repulsivas o atractivas, que son fuertes y de largo alcance o rango, pero estos procesos pueden también ocurrir con biopolímeros que no poseen carga neta. Por ejemplo, se pueden obtener sistemas bifásicos por segregación al mezclar gelatina (10% P/P) y almidón soluble de papa (10% P/P) en solución acuosa y en medio neutro (Benichou *et al.*, 2002)

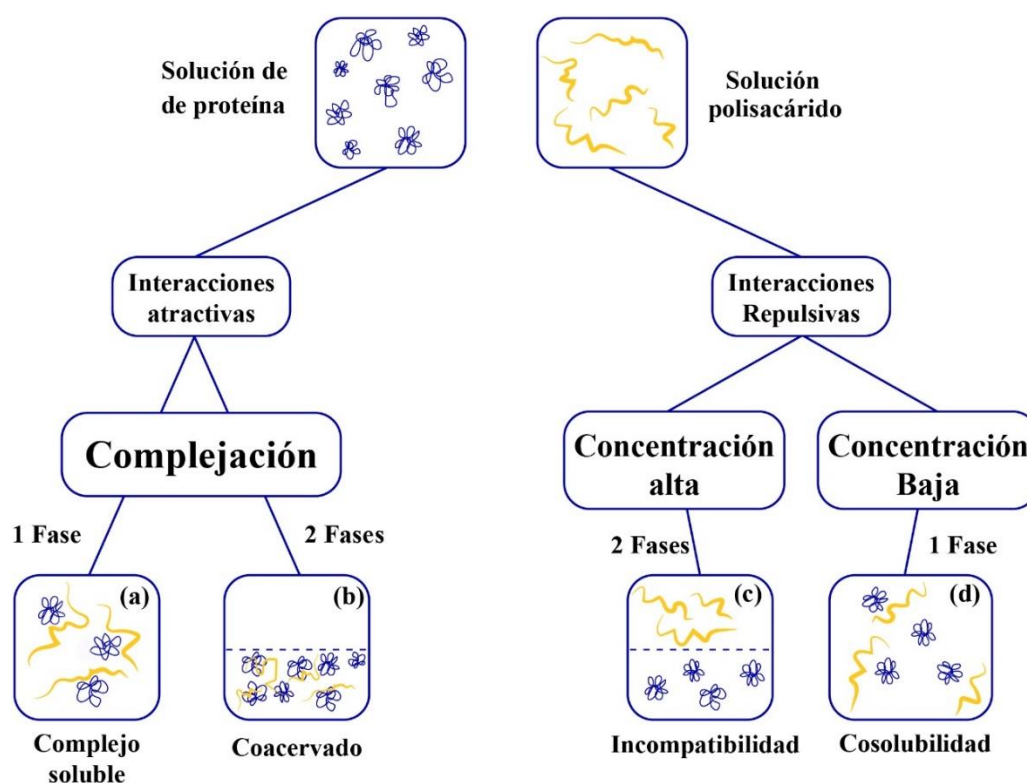


Figura 3: Representación esquemática de los cuatro sistemas posibles al preparar un sistema mixto de proteína-polisacárido. Adaptado de McClements (2006).

En base a lo mencionado, los sistemas mixtos descriptos exhiben estructuras y propiedades diferentes, lo cual modifica las propiedades funcionales de los biopolímeros y tienen una notable influencia en los sistemas que los conforman (Tolstoguzov, 1991).

V. Propiedades funcionales de proteínas

Las propiedades funcionales, también llamadas tecnofuncionales, se definen como las propiedades fisicoquímicas que afectan el comportamiento de las proteínas en los sistemas alimenticios, durante el procesamiento, almacenamiento y consumo de los mismos (Kinsella, 1979). Por su parte Chelftel *et al.* (1993) define las propiedades funcionales como aquellas propiedades de las proteínas, diferentes de las que se relacionan con la nutrición, que condiciona su empleo en alimentos. Las propiedades funcionales de las proteínas se relacionan con las interacciones de las mismas con el agua, los lípidos, los hidratos de carbono, e interacciones entre moléculas de la misma proteína y entre distintas proteínas (Phillips *et al.*, 1994). Las proteínas tienen diversas propiedades funcionales y éstas pueden clasificarse de acuerdo con el tipo de interacción molecular (Tabla 4).

Tabla 4: Clasificación de las propiedades funcionales de las proteínas, según el tipo de interacción. Adaptado de Phillips *et al.* (1994)

Propiedad general	Criterio funcional
Propiedades de hidratación dependientes de la interacción proteína-agua	Solubilidad dispersabilidad. Viscosidad Hinchamiento Adsorción y sorción Retención de agua
Propiedades dependientes de las interacciones proteína-proteína	Precipitación Gelificación
Propiedades de superficie	Propiedades emulsificantes Propiedades espumantes

La clasificación presentada en la Tabla 4, indica la interacción predominante en una dada propiedad funcional, aun cuando los otros tipos de interacciones se encuentran presentes.

V.I. Propiedades de hidratación

La conformación de una proteína en solución depende, fundamentalmente, de sus interacciones con el agua. La mayor parte de los alimentos son sistemas sólidos hidratados y el comportamiento físico-químico y reológico de las proteínas y los otros constituyentes de los alimentos, están influenciados no sólo por la presencia de agua sino también por su actividad. Cuando predominan las interacciones con el agua, las propiedades tecnofuncionales más relevantes son las siguientes:

(i). Solubilidad: La solubilidad es la capacidad de un material proteico en formar soluciones coloidales. El concepto de solubilidad depende de las condiciones experimentales para su determinación y, por ende, es un concepto operativo, dado que no se puede hacer una definición termodinámica. En este contexto, la solubilidad proteica se define como la proporción de nitrógeno (o proteína) de una muestra proteica que se solubiliza luego de un procedimiento específico de solubilización (Pilosofo, 2000). En general, este procedimiento incluye un proceso de agitación suave (por ejemplo, agitación magnética) a una temperatura y tiempo definidos. Luego, las partículas insolubles se remueven por centrifugación en condiciones definidas o por filtración y se procede a la determinación de proteínas en el sobrenadante o el líquido filtrado. La solubilidad proteica depende del estado físico-químico de sus moléculas que podría alterarse por tratamientos de calentamiento, procesamiento, secado y condiciones de almacenamiento, siendo dependiente del pH, temperatura, fuerza iónica y presencia de solventes orgánicos. En general, las proteínas exhiben una solubilidad mínima a un pH igual a su punto isoelectrico y depende marcadamente de la concentración y tipo de sales presentes (*salting in* y *salting out*). Esta propiedad es muy útil en la selección de las condiciones óptimas de extracción de las proteínas de sus fuentes originales. Por ejemplo, el empleo de agua destilada con ajuste a pH 8,0 es un procedimiento adecuado para la extracción de las proteínas de la harina desgrasada de soja en la preparación de APS (Sorgentini y Wagner, 1999). Además, la solubilidad proteica tiene suma relevancia en bebidas y productos emulsionados o espumados.

(ii). Dispersabilidad: Es la capacidad de un material para dispersarse en presencia de agua por inmersión. Esta propiedad tiene suma relevancia en productos liofilizados o secados por aspersión o *spray*.

(iii). Adsorción de agua: Es la aptitud de un material para adsorber agua en forma espontánea cuando se le expone a una atmosfera de humedad relativa superior a la humedad relativa de equilibrio con el material. En principio es un fenómeno superficial, pero si la extensión de la hidratación es importante puede ocurrir absorción, hinchamiento y finalmente, solubilización. Esta propiedad de hidratación tiene particular relevancia en productos de bajo contenido de agua y en procesos de secado y de almacenamiento.

(iv). Absorción de agua: Es la capacidad de un material para embeber agua en su estructura en forma espontánea cuando se le pone en contacto con agua a través de una superficie que se mantiene húmeda o por inmersión.

(v). Retención de agua: Es la capacidad de un material hidratado para retener agua frente a la acción de una fuerza externa de gravedad, centrifugado o de compresión.

(vi). Hinchamiento: Indica el cambio de volumen de un material que acompaña a la hidratación (Pilosof, 2000).

Las últimas tres propiedades son especialmente relevantes en productos semisólidos como embutidos, masas y geles.

V.II. Propiedades de superficie

Las moléculas de proteínas son anfifílicas y por lo tanto tienden a adsorberse en las interfases por su flexibilidad molecular, la capacidad de alterar su conformación y generar asociaciones intermoleculares en la interfase formando películas que la estabilizan (Chelftel *et al.*, 1993; Phillips *et al.*, 1994). Por ende, las propiedades de superficie de las proteínas reflejan la capacidad para su difusión, adsorción, desplegamiento y reordenamiento en la interfase (Wagner, 2000).

Las proteínas son empleadas como agentes surfactantes en sistemas alimenticios espumados o emulsionados debido a su comportamiento interfacial. Generalmente, desde el

instante en que la proteína entre en contacto con la interfase, los restos de aminoácidos no polares se orientan hacia la fase no acuosa y los polares hacia la fase acuosa, favoreciendo su adsorción, asociada a una reducción de la energía libre del sistema.

V.II.I. Tensión superficial e interfacial

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, 2003). Para fines prácticos se asume que la interfase es planar y de grosor infinitesimal, pero esto ignora la naturaleza altamente dinámica de la región interfacial, así como también la estructura y organización de todas las moléculas involucradas (McClements, 2016). Como se mencionó previamente (sección IV), las moléculas de agua son capaces de formar puentes de hidrógeno con sus vecinas, pero sólo pueden interaccionar por fuerzas de Van der Waals más débiles con las moléculas de triglicéridos. Por consiguiente, el incremento del área de contacto entre las dos fases es termodinámicamente desfavorable porque involucra el reemplazo de fuertes interacciones entre moléculas de agua por interacciones más débiles con las moléculas de triglicéridos de la fase lipídica. Para hacer un análisis termodinámico completo, se deben considerar tanto la organización estructural de las moléculas en la interfase (ligada a la entropía) como sus energías de interacción (ligadas a la entalpía). En base a esto, el fenómeno de separación de fases en un sistema de aceite y agua minimiza la energía libre y está dominado por el efecto hidrofóbico. En conclusión, la energía libre (ΔG) necesaria para incrementar el área de contacto (ΔA) entre dos fases inmiscibles, a temperatura y presión constante es:

$$\Delta G = \gamma_i \cdot \Delta A \quad (1)$$

γ_i es la tensión interfacial. Este término se aplica para sistemas de dos fases inmiscibles condensadas (por ejemplo, agua y aceite). Si una de las fases es un gas (por ejemplo, agua y aire), en la ecuación 1 la tensión interfacial se reemplaza por la tensión superficial (γ_s). La Figura 4 representa esquemáticamente las interacciones que se establecen en un líquido en contacto con el aire. Las moléculas presentes en el seno de la fase condensada están sometidas a atracciones casi simétricas; las de la superficie, por el contrario, se encuentran parcialmente rodeadas, y sólo experimentan interacciones atractivas desde el seno del líquido. La atracción tiende a arrastrar a las moléculas de la superficie hacia el interior y provoca una disminución

del área entre las fases. Por ende, desde el punto de vista conceptual, la tensión superficial e interfacial puede ser entendida como una fuerza contráctil que tiende a minimizar el contacto entre las dos fases inmiscibles. (Fennema, 1985; Adamson, 1990).

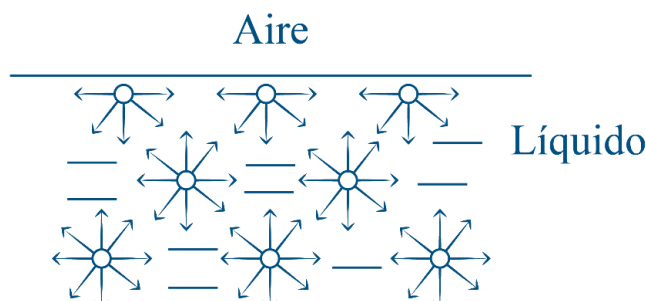


Figura 4: Fuerzas de interacción entre las moléculas de un líquido en contacto con el aire.

El valor de la tensión superficial e 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 ambos parámetros. (Israelachvili, 1992; Evans y Wennerstrom, 1994). La tensión superficial e 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). Ambos parámetros pueden expresarse 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 ($\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$).

La sustancia que disminuye la tensión superficial e interfacial durante su adsorción y en la interfase recibe el nombre de tensoactivo. La sustancia tiende a acumularse en la interfase y la energía libre del sistema luego de la adsorción es menor que la del sistema previo a la adsorción, siendo esta diferencia determinada por cambios en la energía de las interacciones entre las moléculas involucradas en el proceso (de las fases inmiscibles y del tensoactivo) y también por efectos entrópicos (McClements, 2016). Este cambio en la energía libre se manifiesta a través de una disminución de la tensión superficial o interfacial debido a que el número de contactos desfavorables entre las moléculas de las fases inmiscibles se reduce luego de la adsorción de la sustancia activa superficialmente. La disminución de la tensión superficial e interfacial por la presencia de un tensoactivo se puede evaluar mediante la definición del concepto de presión superficial o interfacial (π).

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (2)$$

γ_0 y γ son las tensiones superficiales o interfaciales entre la fase acuosa y oleosa o gaseosa en ausencia y presencia de agente tensoactivo, respectivamente (McClements, 2016; Schramm, 2006).

V.II. II. Cinética de adsorción en la interfase

Cuando se incorpora una proteína como agente tensoactivo en un sistema disperso, la velocidad con la que se adsorbe en la interfase depende de diversos factores relevantes que determinan su eficacia como agente espumante o emulsificante. La velocidad de adsorción de una proteína depende sus características estructurales (PM, flexibilidad estructural, estado conformacional), las propiedades de la fase continua (viscosidad, polaridad) y las condiciones del entorno (temperatura) (McClements, 2016). La proteína adsorbida adopta una nueva conformación en la interfase, que minimiza la energía libre del sistema. Según Israelachvili (2011) en las interfases aceite/agua y aire/agua una proteína adopta la siguientes conformaciones (Figura 5):

(i). Fila (train): Es la sección de la molécula que está en contacto directo con la interfase e intervienen restos aminoacídicos hidrofóbicos

(ii). Lazo (loop): Es la sección de la macromolécula que está suspendida en el seno de la fase acuosa y está conformado mayoritariamente por restos aminoacídicos de carácter hidrofílico.

(iii). Cola (tail): Es la sección terminal de la molécula. Se encuentra compuesto mayormente de restos aminoacídicos hidrofílicos que se orientan hacia la fase acuosa.

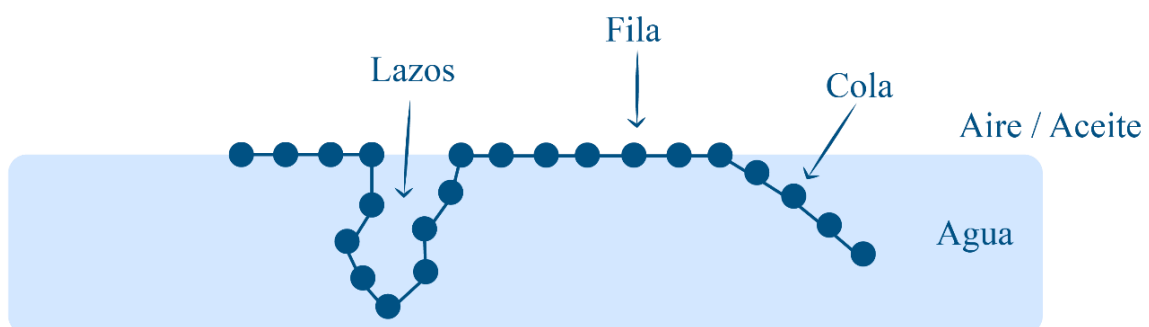


Figura 5: Representación de las diferentes configuraciones que adopta una macromolécula en las diferentes interfases aire/agua o aceite/agua. Adaptado de: Dickinson (1992) y Bos y van Vliet (2001)

Entre las proteínas presentes en la interfase pueden producirse reacciones de entrecruzamiento por medio de interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y/o covalentes (Dickinson y Matsumura 1991). Por lo tanto, la adsorción de una proteína en la interfase podría ser considerada irreversible en ausencia de otras proteínas con mayor flexibilidad o de pequeñas moléculas tensoactivas, comúnmente llamados surfactantes, que muestran mayor actividad tensoactiva y producen mayores incrementos de la presión superficial (Mackie *et al.*, 2001). No obstante, las moléculas de proteína también pueden cambiar su conformación, posterior a la adsorción, debido a las condiciones del medio como fuerza iónica, pH, temperatura y composición de la fase acuosa (McClements, 2016). En este contexto, es importante destacar que el desplegamiento de las proteínas en la interfase es parcial, en especial en sistemas dispersos preparados con dispersiones acuosas de muestras constituidas por proteínas globulares oligoméricas (por ejemplo, glicinina y β -conglucina de los APS).

La cinética de adsorción de una proteína en la interfase aire/agua o aceite/agua se evalúa mediante la variación de la tensión o presión interfacial o superficial en el tiempo hasta llegar a la presión superficial/interfacial de equilibrio (γ_{eq}). Este equilibrio, que es de naturaleza dinámica, está casi totalmente desplazado hacia la adsorción interfacial, porque esta situación es más favorable desde el punto de vista termodinámico. La adsorción de una proteína en la interfase se produce en tres etapas (Figura 6): (i) difusión de la proteína desde el seno hacia la interfase; (ii) penetración (adsorción) y desplegamiento interfacial, que involucra un reacomodamiento de los grupos funcionales polares hacia la fase acuosa y los no polares hacia la fase oleosa o aire; (iii) reordenamiento en la interfase, formación de multicapa y/o gelificación interfacial. Completada esta última etapa, la interfase se encuentra saturada de proteína y se alcanza el valor de tensión interfacial o superficial de equilibrio (γ_{eq}). Para los agentes emulsificantes no proteicos, sólo tienen lugar las dos primeras etapas, debido a su estructura molecular más simple.

Cuando el espacio disponible en la interfase se satura, se forma una monocapa que da lugar a la formación de una película o film interfacial. En dispersiones proteicas muy concentradas, el exceso de proteína promueve la adsorción en multicapas, dependiendo principalmente de la naturaleza de las interacciones que se establecen entre las moléculas de proteína adsorbidas en la monocapa y las que provienen del medio acuoso (McClements, 2004, 2016).

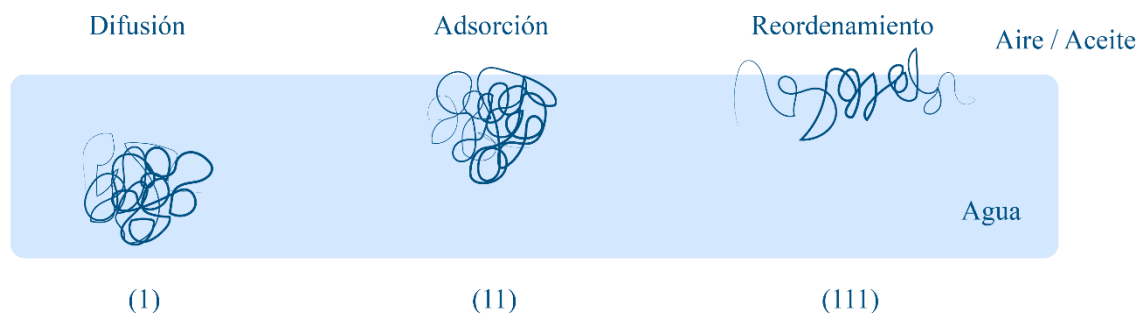


Figura 6: Representación de la cinética de adsorción de una proteína en la interfase aire/agua o aceite/agua: (i) difusión de la proteína hacia la interfase; (ii) penetración de la proteína en la interfase; (iii) reordenamiento de la proteína en la interfase.

Por otro lado, el conocimiento de las propiedades reológicas de las películas interfaciales que se forman es fundamental, porque influyen en la formación y estabilidad de espumas y emulsiones (Dickinson y Matsumura 1991; Bos y Vliet 2001; McClements 2012). Las propiedades mecánicas y viscoelásticas han sido relacionadas con la funcionalidad (Kim y Kinsella 1985; Phillips 1981). Las propiedades reológicas y la estructura de las membranas interfaciales, está gobernada por la interacciones entre las macromoléculas que las componen (Rodríguez Patino *et al.*, 2002) por lo cual, las características de las mismas son muy sensibles a la existencia de esas interacciones entre las moléculas presentes en la interfase y las de la fase acuosa (Murray, 2002).

V.II.III. Propiedades espumantes

Las espumas son sistemas bifásicos en los que una fase gaseosa está dispersa en forma de burbujas (Dickinson y Semenova 1992; Thiansilakul *et al.*, 2007). Las burbujas están separadas entre sí por paredes líquidas denominadas películas o lamelas. Según el tamaño de las burbujas y el espesor de la pared, una espuma puede ser tan densa como la fase continua líquida o tan ligera como la gaseosa dispersa (Walstra, 2000). Las geometrías de las burbujas en las espumas son poliédricas y no esféricas, esto ocurre en espumas concentradas en fase gaseosa o posterior al drenado, suelen tener diámetros entre 0,1 a 10 mm (Schramm, 2006). En la Figura 7 se muestra un sistema espumado y su estructura general.

Las espumas se pueden clasificar en los siguientes tipos:

(i). **Espumas esféricas:** Pueden generarse en algunos sistemas burbujas esféricas en espumas jóvenes y cuando la cantidad de gas introducido en el líquido es lo suficiente baja como para que las burbujas formadas conserven su forma esférica, en espumas con una fase acuosa continua gelificada, congelada o de alta viscosidad (ejemplo: en helados de base acuosa o en cremas heladas).

(ii). **Espumas poliédricas:** La relación gas/líquido es tan elevada que las burbujas se ven presionadas una con otras disponiéndose en una estructura tipo panal de abeja (ejemplo: cerveza).

(iii). **Espuma transitoria:** Su denominación es debido a su comportamiento cinético, siendo su vida media aproximada de segundos o minutos (ejemplo: espuma de bebidas fermentadas espumantes, como el champagne).

(iv). **Espumas permanentes:** Son sistemas con una estabilidad superior, posee una vida media del orden de días o semanas, por lo que se puede decir que son estables (ejemplos: merengue de torta)

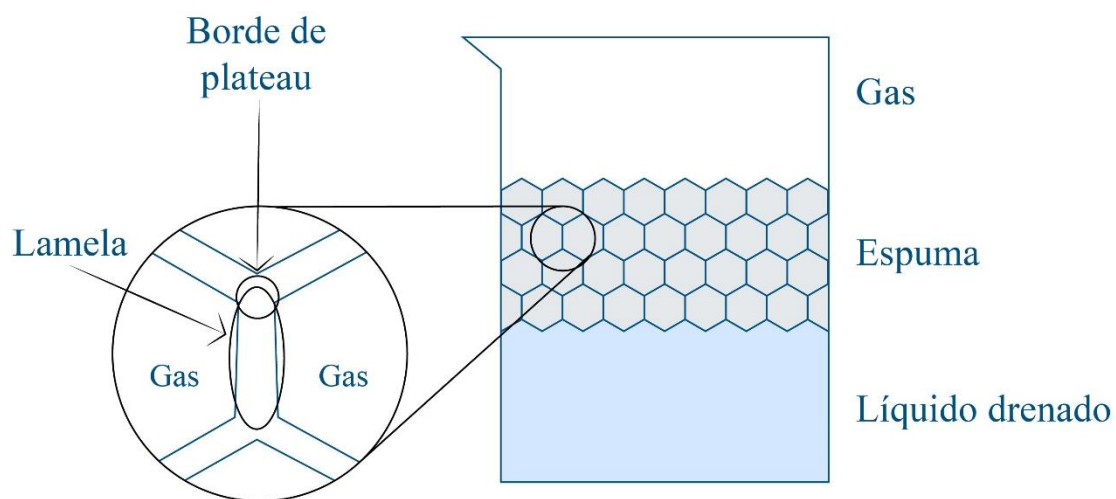


Figura 7: Representación esquemática de un sistema espumado y vista ampliada de la película entre burbujas. Adaptado de Schramm (2006)

V.II.III. I. Formación de espumas

Las proteínas como agentes espumantes deben tener dos efectos sobre las espumas; reducir la tensión superficial, promoviendo la formación de las espumas y la capacidad de estabilizarla, por medio de la formación de una película interfacial con propiedades mecánicas apropiadas para impedir su rápida destrucción (Walstra, 1989). El incremento en la velocidad de difusión de la proteína hacia la interfase aire/agua, promueve la formación de una película con propiedades mecánicas adecuadas para evitar el colapso de las burbujas generadas (Rodríguez Patino *et al.*, 2008). Hay factores extrínsecos e intrínsecos que afectan las propiedades espumantes de las proteínas. Los factores extrínsecos (dependientes de medio acuoso) son: concentración proteica, pH, fuerza iónica; en cambio los intrínsecos de la proteína son: hidrofobicidad, carga neta, flexibilidad, conformación molecular y solubilidad.

El proceso de formación de espuma consiste en incorporar gas a una solución proteica con creación de nueva área interfacial, por lo tanto, se forman burbujas rodeadas por una película proteica (Figura 8). La espuma se puede obtener por diversos métodos: (i). Disolución de gas bajo presión y liberándolo después por descenso de la presión (por ejemplo: gaseosas, cervezas) o formación de gas *in situ* (por ejemplo: masas fermentadas) ;(ii) Inyección de gas a través de un orificio angosto (burbujeo) y batido o agitación con cantidad ilimitada de gas (Wagner, 2000).

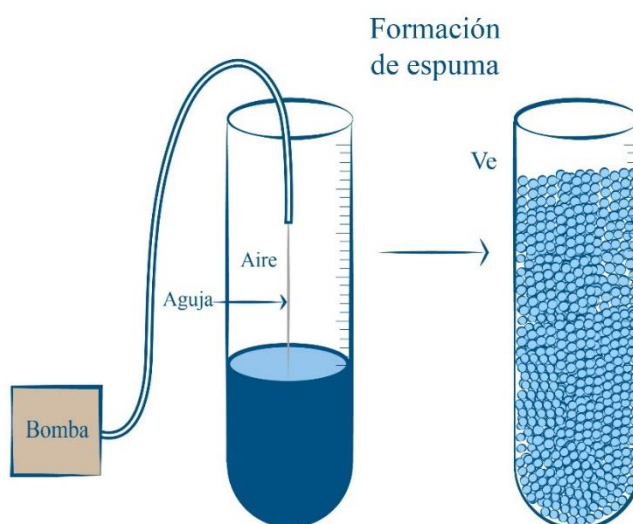


Figura 8: Representación de la formación de una espuma por el método de burbujeo.

Los valores elevados de presión superficial (π_s), promueven la formación de burbujas con tamaño más pequeños y la formación una película interfacial con una alta viscoelasticidad, logra estabilizar las burbujas durante el proceso de formación de la espuma (Rodríguez Patino *et al.*, 2008).

V.II.III. II. Estabilidad de espumas

La estabilidad de una espuma está determinada por la tensión superficial, las propiedades reológicas de la fase continua, las propiedades mecánicas de la película interfacial, el tamaño de las burbujas, la temperatura y la naturaleza de la fase gaseosa. Además, una concentración alta de tensoactivo puede proporcionar una cobertura suficiente en la superficies de las burbujas, logrando estabilizarlas frente a los procesos de colapso durante la formación (Denkov *et al.*, 2020). Para tener una comprensión precisa de los mecanismos que controlan la estabilidad de las espumas se requiere tener información sobre la estructura y las propiedades mecánicas de las capas adsorbidas en la interfase aire/agua y la presión superficial a tiempos prolongados de adsorción (Dickinson, 2020).

El proceso de desestabilización en una espuma consiste en la tendencia de la fase gaseosa discontinua a formar una fase continua por aproximación y/o fusión de las burbujas, a fin de alcanzar un mínimo de área superficial, que es la condición de mínima energía libre (Wagner 2000). Las espumas se desestabilizan por tres mecanismos que pueden actuar simultáneamente (Figura 9):

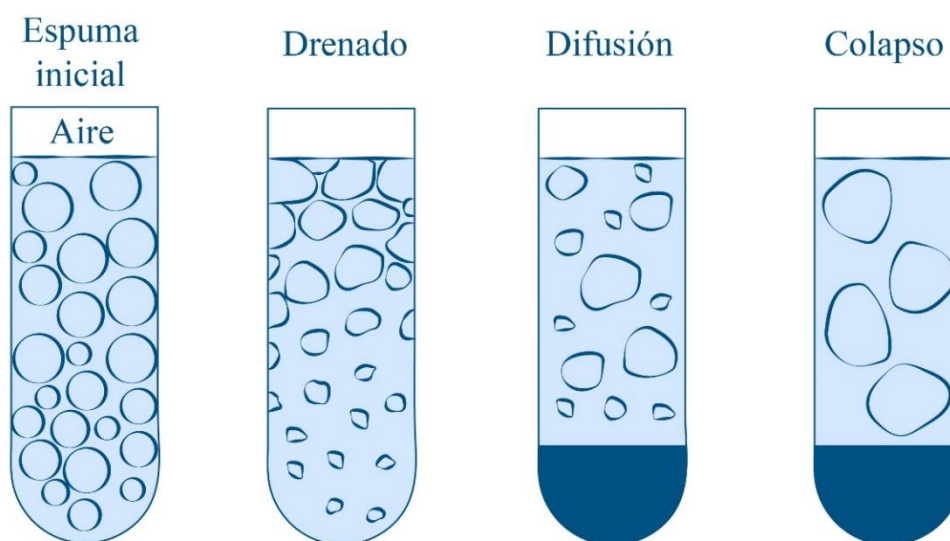


Figura 9: Representación esquemática de los procesos de desestabilización de una espuma.

(i). Drenado: Consiste en la migración del líquido que ocupa el espacio entre dos burbujas de aire y genera estrechamiento de la película líquida que las separa. Este fenómeno ocurre debido a la acción de la gravedad y por la diferencia de densidad entre la fase líquida y gaseosa.

(ii). Difusión o desproporción: consiste en el transporte o migración del gas contenido en las burbujas pequeñas hacia las más grandes (Murray 2002; Ettelaie *et al.*, 2008). La fuerza impulsora para que ocurra este fenómeno es un gradiente de presión de Laplace a través de la superficie de la burbuja, generando una mayor presión superficial para las burbujas pequeñas. La compresión entre burbujas y la delgadez de la película que la separa (debido al drenado) conduce a la geometría poliédrica. Según la ley de Henry, la solubilidad de un gas es proporcional a su presión, por ende, la solubilidad es mayor en el interior de una burbuja pequeña que el interior de una con un tamaño mayor. Este proceso es auto-acelerado, ya que las burbujas pequeñas se hacen cada vez más pequeñas debido a la difusión y por lo tanto la fuerza impulsora aumenta.

(iii). Colapso: Es la fusión de las burbujas generada por la ruptura de la pared que las separa (lamela), al debilitarse por la disminución de su espesor, generando la reducción del volumen de espuma.

V.II. IV. Propiedades emulsionantes

Las emulsiones son sistemas heterogéneos compuestos por una mezcla de dos fases inmiscibles, una continua y otra dispersa en forma de pequeñas gotas y por ende, desde el punto de vista fisicoquímico son dispersiones coloidales liofóbicas (Damodaran, 2006; McClements, 2016). Muchos alimentos naturales y procesados son emulsiones o lo han sido durante alguna etapa de su producción e incluyen leche y derivados, cremas heladas, mayonesas, aderezos, salsas, licores cremosos, bebidas vegetales, fórmulas infantiles, margarinas y blanqueadores de café. La fase que conforman las gotas se denomina fase dispersa o discontinua y la que conforma el medio dispersante se denomina fase continua. En la mayoría de las emulsiones alimentarias los diámetros de gota varían entre 0,1 y 100 μm y pueden clasificarse convenientemente de acuerdo a la distribución espacial relativa de las fases acuosa y oleosa en (Figura 10): i) emulsiones aceite en agua (“*oil-in-water*”, O/W) donde las gotas de aceite se dispersan en un medio acuoso (ejemplo: leche, mayonesa, blanqueadores de café); ii) emulsiones agua en aceite (“*water-in-oil*”, W/O), donde las gotas de agua están

dispersas en un medio oleoso (ejemplo: manteca y margarinas). Por lo tanto, en las emulsiones O/W la fase dispersa es oleosa y en las emulsiones W/O es acuosa (McClements, 2016).

Además, existen otros sistemas emulsionados de mayor complejidad, denominados emulsiones múltiples, que se caracterizan por el hecho de que las gotas de la fase dispersa contienen a su vez gotas muy pequeñas de líquido inmiscible con el de las gotas que las contiene y por lo general miscible con el de la fase continua. Las emulsiones múltiples más importantes son las de aceite en agua en aceite (“*oil-in-water-in-oil*” O/W/O) y agua en aceite en agua (“*water-in-oil-in-water*” W/O/W). Por ejemplo, una emulsión W/O/W tiene dos fases acuosas, una interna (W_1) y otra externa (W_2), no necesariamente de la misma composición. Las gotas de agua de la fase acuosa interna se encuentran dispersas en gotas de aceite de mayor tamaño y éstas a su vez se dispersan en la fase acuosa externa ($W_1/O/W_2$). Estos sistemas son atractivos para la industria alimentaria ya que la obtención de emulsiones múltiples estables permitiría no sólo una reducción del contenido lipídico total sino también, la liberación controlada de compuestos bioactivos (Garti, 1997; Pal, 2011).

La concentración de gotas en una emulsión se describe en términos de la fracción volumétrica de fase dispersa (ϕ) o de la fracción másica de fase dispersa (ϕ_m). Si V_d y m_d es el volumen y la masa total de las gotas y V_e y m_e , es el volumen y la masa de la emulsión, entonces ϕ y ϕ_m se definen como:

$$\phi = \frac{V_d}{V_e} \quad (3)$$

$$\phi_m = \frac{m_d}{m_e} \quad (4)$$

Ambos parámetros pueden relacionarse conociendo las densidades de las fases dispersa (ρ_d) y continua (ρ_c):

$$\phi_m = \left[\frac{\phi \cdot \rho_d}{\phi \cdot \rho_d + (1 - \phi) \cdot \rho_c} \right] \quad (5)$$

ϕ y ϕ_m coinciden sólo cuando las densidades de las dos fases que constituyen el sistema son iguales (Mc Clements, 2016).

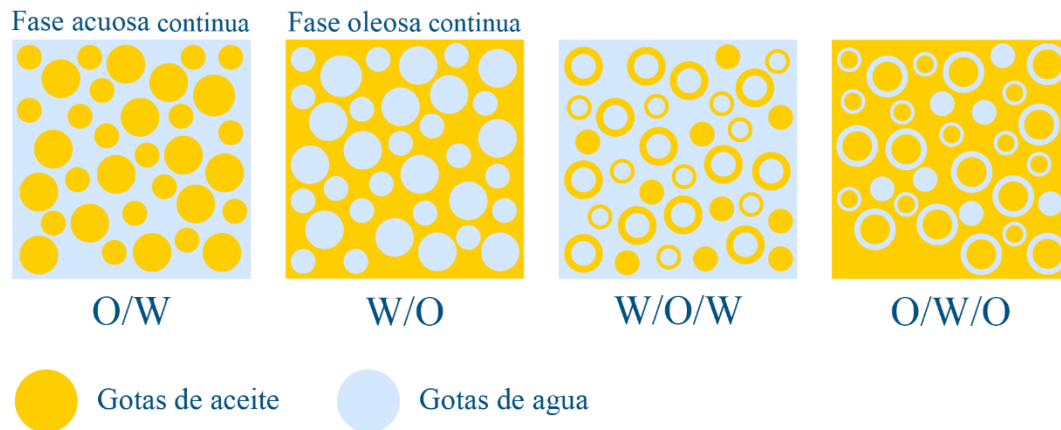


Figura 10: Clasificación de las emulsiones.

V.II. IV.I. Formación de emulsiones

El proceso de convertir dos líquidos inmiscibles en una emulsión se denomina homogeneización y el dispositivo mecánico empleado para llevar a cabo este proceso recibe el nombre de homogeneizador. La homogeneización se realiza en dos etapas, inicialmente la creación de una emulsión a partir de dos fases líquidas separadas se denomina homogeneización primaria, mientras que el proceso de reducir el tamaño de las gotas en una emulsión ya existente o pre-emulsión se denomina homogeneización secundaria (Figura 11). La pre-emulsión se conoce también como emulsión grosera (*“coarse emulsión”*). La creación de un tipo particular de emulsión puede involucrar una homogeneización primaria, secundaria o una combinación de ambas (McClements, 2016).

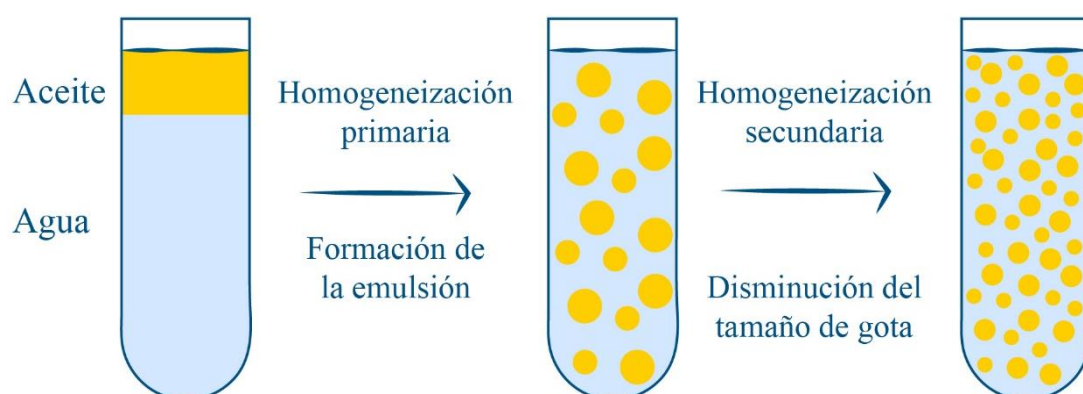


Figura 11: Proceso de formación de una emulsión.

Durante la preparación de una emulsión se pueden distinguir tres procesos críticos: formación y ruptura de las gotas, adsorción del agente emulsificante en la interfase aceite/agua y coalescencia de las gotas. Este último fenómeno se suele denominar “re-coalescencia” (“*re-coalescesce*”) para diferenciarlo del proceso de coalescencia en las emulsiones luego de la homogeneización (sección V.II.IV.V) (Jafari *et al.*, 2008; McClements, 2016). Durante el proceso de homogeneización, la interfase entre las dos fases líquidas inmiscibles se deforma en tal extensión, que comienzan a producirse gotas, en su mayoría, de tamaño muy grande. Estas gotas deben deformarse y romperse para formar gotas de menor tamaño, por fuerzas de ruptura. Las gotas de un líquido dispersas en otro que es inmiscible tienden a adoptar una forma esférica para minimizar la energía libre interfacial (Palazolo, 2006).

El agente emulsificante necesario para la formación de la emulsión debe adsorberse en la interfase, disminuyendo la tensión interfacial. Además, es sumamente importante que el mismo recubra la interfase creada en una escala de tiempo similar a la del proceso de homogeneización. En el caso que la adsorción sea muy lenta en comparación con la capacidad del homogeneizador de generar área interfacial, se produce el proceso de coalescencia de las gotas recién formadas, es decir, la re-coalescencia. Este hecho hace que el proceso de formación de la emulsión no sea eficiente (Ford *et al.*, 1997; Jafari *et al.*, 2008).

V.II. IV.II. Dispositivos de homogeneización

Se han desarrollado distintos tipos de dispositivos de homogeneización para producir emulsiones en alimentos. Cada uno de estos dispositivos tiene sus propias ventajas y desventajas. La elección de un homogeneizador particular depende del volumen de emulsión que se desea preparar, la naturaleza de los materiales de partida, el tamaño de gota deseado y el costo (McClements, 2016).

La intensidad de agitación mecánica se atribuye a la densidad de energía en el líquido (ϵ), la cual es la cantidad de energía mecánica disipada por unidad de volumen y por unidad de tiempo (o la potencia por unidad de volumen). La cantidad total de energía mecánica suministrada debe ser extremadamente grande, debido a la oposición de la presión de Laplace (Walstra, 1983; Ford *et al.*, 1997). La mayor parte de la energía entregada actúa en un tiempo muy corto y localmente, disipándose como calor. Por lo tanto, la temperatura debe controlarse durante la homogeneización, especialmente cuando se emplean dispositivos de alta ϵ .

Tabla 5: Principales dispositivos de homogeneización y sus características. Fuente: Palazolo (2006)

Homogeneizador	Densidad de energía (ϵ) ⁽¹⁾	Modo de operación ⁽²⁾	Mecanismo de ruptura ⁽³⁾	Tamaño de gota ⁽⁴⁾ (μm)	Viscosidad de la muestra ⁽⁵⁾
Homogeneizadores de baja velocidad (sistemas cuchilla)	B	D	L, T	5	B - M
Homogeneizadores de alta velocidad (sistema cuchilla y rotor/estator)	B	D	L, T	2	B - M
Molino coloidal	I	C	L, T	1	M - A
Homogeneizador a válvula de alta presión	A	C	T, C	0,1	B - M
Homogeneizador ultrasónico	A	D	T, C	0,1	B - M
Homogeneizador de membrana	A	C	T	0,1	B - M

¹ A = alta; M= mediana; B = baja; ² C = continuo; D = discontinuo o batch;

³ L= flujo laminar; T= flujo turbulento; C= cavitación; ⁴ tamaño de gota promedio (μm);

⁵ B= baja; M= mediana; A=alta.

Los homogeneizadores de alta velocidad son lo más empleados en la industria alimentaria para mezclar directamente la fase oleosa y acuosa en un proceso tipo *batch*. El aceite y agua puede ser adicionados en un recipiente y los componentes son agitados por una hélice que gira a alta velocidad (~3600 rpm) y existen dispositivos de alta velocidad con diseño rotor/estator que logran velocidades de hasta 25.000 rpm. Las gotas producidas están en el rango entre 2-10 μm (McClements, 2016). Los molinos coloidales son adecuados para la homogeneización de emulsiones de alta viscosidad y tienen un diseño rotor/estator al igual que los homogeneizadores de alta velocidad. La intensidad del esfuerzo de corte en este dispositivo se puede regular por variación de la distancia entre el rotor y el estator. Aunque con los molinos coloidales se pueden homogeneizar fases separadas, son más eficientes para la reducción del tamaño de gota. Los homogeneizadores a válvula de alta presión son sólo eficaces para reducir el tamaño de gota de una emulsión preexistente y, por ende, realizan una

homogeneización secundaria. A través de una bomba, la pre-emulsión es forzada a pasar a través de una válvula a presión elevada (entre 10 y 150 MPa).

En los homogeneizadores ultrasónicos, la fuente convierte el voltaje suministrado (energía eléctrica) en ondas ultrasónicas (superior a 20 kHz) que se transmiten al seno del líquido y producen millones de cavidades microscópicas. El colapso de estas cavidades genera ondas de choque que producen deformación y ruptura de las gotas. La temperatura dentro de las cavidades es extremadamente alta y la presión puede ser superior a 500 atmósferas. Sin embargo, los tiempos de vida media de las cavidades están en el orden de los microsegundos, con lo cual la energía liberada por cada cavidad es mínima. La alta densidad de energía de este dispositivo de homogeneización se atribuye al efecto acumulativo del gran número de cavidades generadas. Hay distintos diseños para uso de laboratorio (piezoeléctricos, puntas sonicadoras) e industrial (generación de campo ultrasónico por aguja vibrante) (McClements, 2016).

V.II. IV.III. Agentes emulsificantes

La homogeneización de agua y aceite para formar una emulsión es posible usando dispositivos como un homogeneizador de alta velocidad, pero las dos fases se separan rápidamente. Luego de una colisión, las gotas tienden a unirse fácilmente con sus vecinas debido a que el contacto de las moléculas de triglicéridos de la fase lipídica y las moléculas de agua es termodinámicamente desfavorable. La fuerza impulsora para la separación de fases es el efecto hidrofóbico descrito previamente (sección IV). Por ende, las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables. No obstante, pueden lograrse sistemas cinéticamente estables o metaestables por adición de cuatro tipos de ingredientes llamados emulsificantes, modificadores de textura, agentes de pesado (*weighting agents*) e inhibidores de la desproporción (*ripening inhibitors*), clasificados según su modo de acción (McClements, 2016).

Los emulsificantes son sustancias activas superficialmente o tensoactivas que se adsorben en la interfase aceite/agua de las gotas que se forman durante el proceso de homogeneización. En la interfase pueden estar presentes uno o varios agentes emulsificantes que estabilizan las emulsiones por dos mecanismos: disminución de la tensión interfacial y otorgamiento de rigidez a la película interfacial o film interfacial que rodea a las gotas (Lucassen-Reynders, 1993; McClements, 2016). Los agentes emulsificantes tienen la propiedad de ser anfifílicos, es decir, son afines tanto al agua como al aceite. Estas moléculas

tienen regiones polares que interaccionan con la fase acuosa y regiones no polares que se orientan hacia la fase lipídica. De esta manera, los emulsificantes conforman la película interfacial, interactuando con ambas fases y haciendo posible la formación de la emulsión. Los emulsificantes pueden clasificarse, según su naturaleza química, en dos grupos: emulsificantes proteicos, los cuales poseen distintos grados de polaridad y carga, por lo tanto, una afinidad variable por las fases oleosa y acuosa (Damodaran, 1997) y emulsificantes no proteicos, grupo dentro del cual se encuentran los fosfolípidos, mono y diglicéridos entre otros (Dickinson y McClements, 1995). No obstante, esta clasificación puede ser actualizada para incluir los polisacáridos que tienen actividad superficial, como el hidroxipropilmetilcelulosa que dado a su alta hidrofobicidad le permite reducir la tensión interfacial e interactuar en la interfase aceite/agua, formando una película con alta viscoelasticidad (Camino *et al.*, 2011). El polisacárido soluble de soja (SSPS) también actúa como emulsificante, debido a las proteínas asociadas a la cadena del polisacárido que le permiten ingresar y anclarse en la interfase aceite/agua (Xu y Liu, 2016).

V.II. IV.IV. Emulsiones multicapa

En los últimos años, se han diseñado emulsiones con características estructurales especiales que tienen un gran interés en la industria alimentaria debido a sus potenciales ventajas respecto a las emulsiones convencionales O/W. Además de las emulsiones múltiples (sección V.II.IV), este grupo incluye a las emulsiones multicapa O/W (*multi-layer emulsions*). En las emulsiones convencionales (monocapa) existen ciertas limitaciones en relación con las propiedades funcionales que se pueden conseguir mediante la aplicación de los métodos para la formación de emulsiones, debido a que los sistemas emulsionados simples exhiben una estabilidad limitada frente a modificaciones de pH, la presencia de sales y a tratamientos de estrés tecnológico como: calentamiento, deshidratación, agitación orbital y ciclos de congelación-descongelación. Estas limitaciones han llevado a la realización de investigaciones con el objetivo de lograr métodos alternativos mediante estrategias innovadoras (Guzey y McClements 2006).

La formación de emulsiones multicapa O/W es una estrategia, donde distintos tipos de biopolímeros se ubican en la interfase formando múltiples membranas alrededor de las gotas de aceite, mediante una técnica conocida como deposición electroestática capa sobre capa (Figura 12). Las emulsiones multicapa O/W consisten en pequeñas gotas de aceite dispersas en un medio acuoso, recubiertas por una membrana interfacial formada por polímeros de carga

opuesta, formando complejos mediante interacciones electrostáticas (Guzey y McClements 2007; McClements 2012; Dickinson 2015). Estas emulsiones se logran formando, inicialmente una emulsión primaria, donde el agente emulsificante (que debe ser un electrolito) se adsorbe rápidamente a las gotas de aceite que se forman durante el proceso de homogeneización. Posteriormente se adiciona otro polielectrolito (con carga opuesta) para que se incorpore a la superficie de la gota cubierta con el agente emulsificante, obteniendo una emulsión secundaria, con una bicapa biopolimérica formada alrededor de las gotas de aceite (Guzey y McClements 2006). La metodología descrita se puede repetir para la formación de tres o más capas alrededor de las gotas de emulsión. Las emulsiones multicapa O/W suelen tener una mayor estabilidad frente a los tratamientos de estrés tecnológico en relación a las emulsiones monocapa (Thanasukarn *et al.*, 2006).

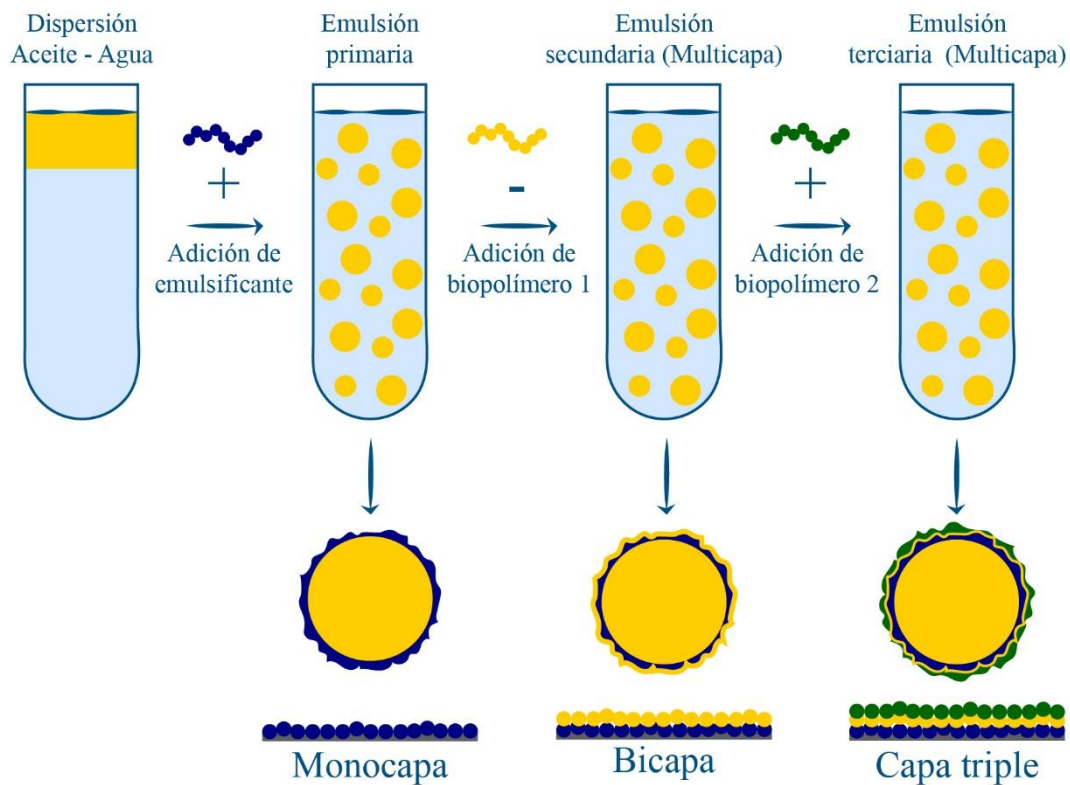


Figura 12: Utilización de la técnica *capa sobre capa* para la formación de emulsiones aceite/agua multicapa. Adaptado de McClements, (2012).

V.II. IV.V. Estabilidad de emulsiones

Como se mencionó anteriormente, las emulsiones son termodinámicamente inestables, pero pueden adquirir cierta estabilidad cinética cuando se controlan los procesos de desestabilización física. Estos procesos son la separación gravitacional, la floculación, la coalescencia (total o parcial), desproporción e inversión de fases (Márquez, 2009). Alguno de estos mecanismos, que se describen seguidamente, pueden transcurrir en forma simultánea o la ocurrencia de uno de ellos puede facilitar la del otro.

(i). Separación gravitacional (cremado² y sedimentación): La separación gravitacional es un cambio en la distribución espacial de las gotas causado por el movimiento ascendente (Figura 13 a) o descendente (Figura 13 b) de las mismas debido a su menor o mayor densidad que la fase continua, respectivamente (Walstra, 1996). El cremado (*creaming*) es un proceso de separación gravitacional que tiene lugar en emulsiones O/W, en tanto que la sedimentación de gotas es más común en emulsiones W/O. Durante el almacenamiento estacionario el cremado conduce a la formación de una fase enriquecida en gotas en la parte superior del recipiente denominada fase crema. De acuerdo con la ley de Stokes, la velocidad de cremado en una emulsión es directamente proporcional al tamaño de la gota de la fase dispersa y a la diferencia de densidades de las fases dispersa y continua, e inversamente proporcional a la viscosidad de la fase continua. La velocidad de cremado también depende de los siguientes factores: i) la concentración de la fase dispersa de la emulsión (ϕ y ϕ_m , ecuaciones 2 y 3), en este caso, la velocidad de cremado en emulsiones concentradas es menor que en emulsiones diluidas, debido a las interacciones hidrodinámicas entre las gotas; ii) la polidispersidad, porque la presencia simultánea de gotas de distintos tamaños puede afectar positiva o negativamente al cremado dependiendo de la relación entre el número de gotas grandes, pequeñas y el tipo de flóculo formado; iii) la floculación, que aumenta la velocidad de cremado en emulsiones diluidas, debido a que los flóculos son de mayor tamaño que las gotas individuales, mientras que retarda el cremado en emulsiones concentradas; esto se atribuye a la formación de una red tridimensional de que previene el movimiento de las gotas individuales o cuando los flóculos formados son poco compactos e hidratados; iv) las cargas eléctricas, ya que las gotas que exhiben carga superficial se mueven más lentamente que las neutras, debido a la repulsión

² El término “cremado” no es aún aceptado por la Real Academia Española (<https://www.rae.es/>) como término para describir la desestabilización de una emulsión por separación gravitacional. No obstante, es un término de uso frecuente y será empleado como tal en este trabajo.

electrostática entre gotas; v) la cristalización de la grasa debido a que la grasa sólida tiene mayor densidad que el aceite líquido, además de inducir la coalescencia parcial entre gotas, como se explicará más adelante (McClements, 2016).

(ii) Floculación: Las gotas en las emulsiones están en movimiento continuo por efecto de la energía térmica, la gravedad y las fuerzas mecánicas aplicadas, lo que favorece la colisión entre gotas, las cuales pueden apartarse o quedar agregadas, dependiendo de la magnitud relativa de las fuerzas repulsivas y atractivas entre ellas. La floculación es el proceso en el cual dos o más gotas se unen para formar un agregado llamado flóculo en que cada gota retiene su identidad, sin fusionarse, llevando a una disminución en el número de partículas presentes en la emulsión (Figura 13 c). El proceso puede ser reversible o irreversible y está controlado por un balance global entre las fuerzas de atracción (electrostáticas, de van der Waals, hidrofóbicas y por depleción) y de repulsión (electrostáticas, estéricas y de hidratación) entre las gotas. El grado de floculación alcanzado depende de dos factores: la frecuencia de las colisiones (F_C), que se define como el número de encuentros entre gotas por unidad de tiempo y por unidad de volumen de emulsión y la eficiencia de las colisiones (E_C), que es la fracción efectiva de colisiones que conducen a la agregación. Así, los factores que afectan la F_C en las emulsiones son: el movimiento browniano, las colisiones debidas a la separación gravitacional (cremado o sedimentación) y las debidas a la aplicación de fuerzas de corte o cizalla durante la producción, transporte o almacenamiento. La E_C está asociada fundamentalmente al balance de las interacciones entre gotas y si predominan las interacciones atractivas un evento de colisión entre gotas será muy eficiente conduciendo a la formación de un flóculo. En este contexto, la presencia de iones multivalentes en la fase continua de una emulsión electrostáticamente estabilizada tiene fuerte influencia en su estabilidad frente a la floculación; en primer lugar, porque los iones multivalentes son mucho más efectivos para apantallar las interacciones electrostáticas repulsivas entre gotas que los iones monovalentes, y en segundo lugar, porque ellos son capaces de formar puentes iónicos entre dos gotas que tienen la misma carga. Por ejemplo, la adición de iones de calcio en una emulsión estabilizada con proteínas que contiene gotas con carga superficial neta negativa puede causar la floculación debido a que los iones reducen la repulsión electrostática entre gotas y forman puentes proteína-calcio-proteína entre las mismas (McClements, 2016).

(iii) Coalescencia: Es un proceso que genera un aumento del tamaño de las gotas y que conduce a la reducción del área interfacial. Se produce por aproximación, choque, deformación

y ruptura de la película interfacial; las gotas individuales se unen entre sí perdiendo su identidad y formando gotas más grandes (Figura 13d). Este fenómeno, que a diferencia de la floculación es irreversible, depende de la F_C y E_C entre gotas, pero también de la resistencia y viscoelasticidad de la película interfacial, en especial cuando las gotas están en contacto prolongado. La coalescencia promueve la separación gravitacional de las gotas, debido a un aumento en su tamaño. En emulsiones O/W la coalescencia avanzada conduce a la liberación del aceite (*oiling off*), es decir, la formación de una capa de aceite libre en la parte superior del recipiente contenedor, (Figura 13e); en cambio, en emulsiones W/O, la liberación de agua conduce a la acumulación de una capa en la parte inferior del recipiente (McClements, 2016).

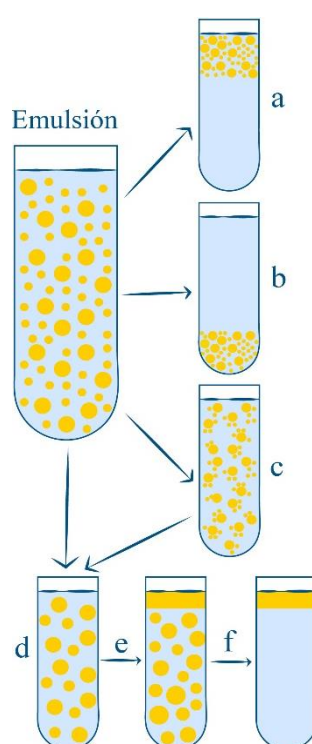


Figura 13: Mecanismos de desestabilización más importantes de una emulsión aceite en agua (O/W): **a)** cremado; **b)** sedimentación; **c)** floculación; **d)** coalescencia; **e)** liberación de aceite (*oiling off*) y **f)** separación de fases. Adaptado de Wagner (2000).

(iv) Coalescencia parcial: Este mecanismo ocurre en emulsiones O/W cuando las gotas son en parte cristalinas y cuando la fase oleosa contiene o directamente es una grasa, ya que a temperatura ambiente tiene tendencia a cristalizar. También puede ocurrir en emulsiones formuladas con aceites y que son sometidas a temperatura de almacenamiento muy bajas, en las cuales los triglicéridos también pueden cristalizar. En la coalescencia parcial, las gotas se

unen entre sí por medio de cristales de grasa que sobresalen de las mismas y atraviesan la interfase de sus vecinas dando lugar a la formación de agregados. El proceso no es una floculación, ya que involucra la ruptura del film interfacial (Figura 14). No obstante, las gotas retienen en parte su identidad debido a que los cristales que se hallan dentro de ellas evitan que se fusionen completamente. Es importante destacar que, para que el proceso de coalescencia parcial sea efectivo, la cristalización de la grasa debe ser parcial y no total debido a que los cristales que mantienen unidas a las gotas debe ser solvatados por la grasa líquida (Boode *et al.*, 1993; Walstra, 1996). Además, la desestabilización de emulsiones O/W formuladas con aceites frente a la congelación se explica en parte por la coalescencia parcial debido a la cristalización parcial de los triglicéridos que componen el aceite durante el almacenamiento congelado (McClements, 2004; Palazolo, 2006). Finalmente, cuando la emulsión se somete a una temperatura por encima de la del rango de fusión de la materia grasa se produce la coalescencia total (Figura 14).

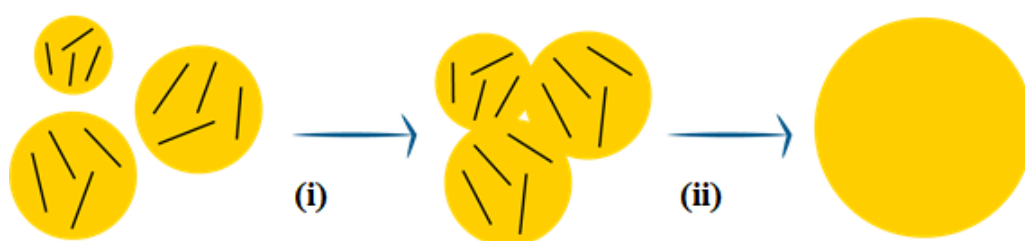


Figura 14: Representación esquemática de desestabilización de una emulsión O/W por coalescencia parcial. Los cristales de grasa de una gota (representados por barras negras) pueden penetrar el dominio de otra gota por ruptura del film interfacial, formando un agregado (i); si la temperatura aumenta por encima de la de fusión de los cristales de grasa se produce la coalescencia total (ii)

v) Desproporción de Ostwald (Ostwald ripening): Es el crecimiento del tamaño de las gotas grandes a expensas de gotas pequeñas, sin ruptura del film interfacial ni floculación. Este fenómeno se atribuye al transporte de masa de fase dispersa desde las gotas pequeñas a las de mayor tamaño a través de la fase continua. La contribución de la desproporción de Ostwald es despreciable en la mayor parte de las emulsiones O/W debido a que la solubilidad de los triglicéridos en agua o en medios acuosos es extremadamente baja o nula. Sin embargo, es importante en algunas emulsiones que contienen lípidos que tienen una solubilidad mayor en

agua (aceites esenciales) o cuando la fase acuosa continua contiene alcohol (licores cremosos) (McClements, 2016; Taylor, 1998).

(vi) Inversión de fases: Es un proceso de desestabilización que involucra un cambio de una emulsión O/W a una W/O o viceversa. Este proceso es esencial en la manufactura de la manteca a partir de la crema de leche (McClements, 2005; Walstra, 2003). Por el contrario, en otros alimentos emulsionados, la inversión de fase es indeseable y debería ser evitada. La inversión de fase es un proceso extraordinariamente complejo y puede ser inducido por dos fenómenos: i) cambios en las características del agente emulsificante y ii) cristalización de la grasa. En el primer caso, se puede generar un cambio en la geometría del agente emulsificante por un cambio en la composición de la emulsión o en las condiciones del entorno (temperatura, adición de sales, adición de alcohol); en el segundo caso, se producen cambios en la emulsión que favorecen la cristalización de la grasa y conducen a una coalescencia parcial extensiva (temperatura y agitación mecánica). La inversión de fase promovida por la cristalización de la grasa se favorece cuando la emulsión tiene una elevada fracción volumétrica o másica de fase dispersa (por ejemplo, en la crema de leche) (Campbell *et al.*, 1996; McClements, 2016).

V.II. IV.VI. Tratamientos de estrés tecnológico

En la industria alimentaria las emulsiones suelen ser sometidas a diferentes condiciones durante su procesamiento, almacenamiento y transporte, promoviendo la desestabilización de las emulsiones cambios irreversibles en las membranas interfaciales. Algunas de los tratamientos más empleados son los siguientes:

(i) Procesamiento térmico: En algunos procesos las emulsiones son sometidas a procesos térmicos tales como cocción, pasteurización y esterilización (Srinivasan *et al.*, 2003). El incremento de la temperatura aumenta la F_C entre las gotas debido a la agitación térmica (McClements, 2016). Las emulsiones estabilizadas con proteínas globulares son altamente sensibles a los tratamientos térmicos, debido a que los cambios conformacionales en la interfase, asociados a la desnaturalización, exponen restos aminoácidos reactivos (tiol o no polares) que estaban ocultos en la cadena polipeptídica. Los grupos reactivos expuestos incrementan la intensidad de las interacciones atractivas entre las gotas durante el tratamiento térmico, aumentando la E_C y, por ende, la susceptibilidad de las emulsiones a la floculación y la coalescencia. Las emulsiones preparadas con proteínas que no sufren cambios

conformacionales importantes por efecto de los tratamientos térmicos (por ejemplo, las presentes en el caseinato de sodio) tienen menor susceptibilidad a la desestabilización (Kim *et al.*, 2002; McClements, 2004).

(ii). Estrés mecánico: En emulsiones O/W estabilizadas por proteínas como agentes emulsificantes y en condiciones estacionarias de almacenamiento, la coalescencia es un proceso lento de desestabilización comparado con el cremado y la floculación. Por tal motivo, para evaluarla, o aun detectarla, se recurre en muchas ocasiones a los test acelerados de estabilidad (Britten y Giroux, 1991; McClements, 2016). Durante el almacenamiento estacionario, la estabilidad a la coalescencia de las emulsiones preparadas con proteínas es relativamente elevada debido a que hay fuertes interacciones repulsivas de corto alcance que evitan la ruptura del film interfacial. Sin embargo, hay una serie de situaciones en las que se puede promover la coalescencia de las gotas debido a la aplicación de tratamientos como agitación mecánica y centrifugación, que incrementan la F_C entre las gotas. La susceptibilidad a la coalescencia se incrementa si la E_C es elevada en condiciones del entorno (pH, fuerza iónica) donde predominan las interacciones atractivas o por la formación de películas interfaciales relativamente débiles (McClements, 2004)

(iii). Enfriamiento y congelación/descongelación: La congelación es una tecnología de conservación ampliamente utilizada para preservar las propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos, así como para evitar el deterioro microbiano y químico (Thiebaud *et al.*, 2002). No obstante, en las emulsiones, los tratamientos de congelación y descongelación son altamente desestabilizantes, por lo que se deben evaluar estrategias que promuevan el mantenimiento de la integridad del film interfacial durante el almacenamiento congelado y la descongelación (McClements, 2004; Palazolo *et al.*, 2011; Cabezas *et al.*, 2019). En términos generales, la estabilidad frente a la congelación-descongelación de las emulsiones se relaciona con dos aspectos principales, que pueden operar en forma simultánea: i) las transiciones de fase, como la formación de hielo y la cristalización de los triglicéridos en la fase lipídica y ii) los cambios en las condiciones del entorno que rodea a las gotas. La cristalización del hielo promueve el confinamiento de las gotas en un volumen reducido de fase acuosa no congelada y los cristales de grasa aumentan la susceptibilidad a la coalescencia parcial. Al mismo tiempo, al producirse la cristalización del hielo, el pH, la fuerza iónica y la viscosidad de la fase acuosa no congelada se modifican en forma significativa, lo cual puede afectar la funcionalidad de las

proteínas u otros agentes emulsificantes adsorbidos en la interfase, promoviendo su desorción (Ghosh y Coupland 2008; Degner *et al.*, 2014).

iv) Secado: Las emulsiones O/W se someten a tratamientos de secado para formar productos emulsionados en polvo que pueden ser utilizados como ingredientes en la formulación de alimento o que pueden ser hidratados por el consumidor antes de su consumo (por ejemplo, leche en polvo y fórmulas infantiles). Los tratamientos más empleados son el secado por aspersión o por *spray* y la liofilización. En las emulsiones preparadas con proteínas globulares el secado por *spray* puede promover la desnaturalización debido a las altas temperaturas empleadas en el proceso o por la generación de burbujas de aire donde las proteínas se pueden adsorber. Además, el incremento de la temperatura aumenta la F_C de las gotas en la emulsión. La liofilización involucra la remoción del agua por sublimación, y, por ende, requiere un tratamiento previo de congelación que en condiciones inadecuadas pueden ser altamente desestabilizante para las emulsiones (McClements, 2004). En términos generales, en ambos tratamientos, la estabilidad de las emulsiones debe asegurarse a través de una formulación adecuada; la adición de ingredientes ejerce un efecto protector a nivel de la fase continua (por ejemplo, la inhibición de la formación de hielo por adición azúcares y/o polioles) y a nivel interfacial. (Hogan *et al.*, 2001; Sliwinski *et al.*, 2003)

(v). Cambios de pH y fuerza iónica: Las películas formadas por proteínas suelen modificar sus propiedades mecánicas y su carga superficial debido a cambios en las condiciones del entorno químico (Claesson *et al.*, 2004). Las emulsiones estabilizadas con proteínas son altamente sensibles a los efectos que ejercen los cambios de pH y de la fuerza iónica. Las gotas tienden a flocular en valores de pH cercano al del punto isoeléctrico de las proteínas adsorbidas y también cuando la fuerza iónica excede un nivel particular, debido a que la repulsión electrostática no es lo suficientemente fuerte para balancear el impacto de las distintas interacciones coloidales atractivas (Van der Waals, hidrofóbicas o depleción) (Kulmyrzaev y Schubert, 2004; McClements, 2016). En este contexto, en algunos casos, la desestabilización de la emulsión se promueve a través de la adición de sales como en la obtención del tofu a partir de la leche de soja (Peng *et al.*, 2016).

VI. Métodos de caracterización de sistemas dispersos

Para el estudio de los sistemas dispersos en esta Tesis se emplearon diferentes técnicas que permitieron entender las características y propiedades fisicoquímicas de los sistemas. A continuación, se detallan los fundamentos teóricos de algunas de las técnicas empleadas.

VI.I. Técnicas de dispersión de luz

Como su nombre lo indica las técnicas de dispersión de luz se basan en la capacidad de las partículas de dispersar un haz de luz incidente. De acuerdo con el tipo de luz utilizada y el ángulo en el que se realicen las medidas, estas técnicas pueden brindar mucha información sobre la partícula estudiada. Específicamente en el estudio de los sistemas dispersos estas técnicas han sido empleadas para conocer aspectos como tamaño, estado de agregación y asociación. En este trabajo se emplearon dos de estas técnicas, la dispersión estática de la luz (SLS, *static light scattering*) y dispersión dinámica de la luz (DLS, *dynamic light scattering*)

VI.I.I. Dispersión estática de luz (SLS)

La dispersión de luz estática es una técnica usada para determinar principalmente el factor de forma y estructura de partículas en suspensiones coloidales y tamaño de gota de emulsiones comprendidas entre 0,1 a 1000 μm . El método consiste en incidir luz láser sobre una muestra y medir la intensidad de la luz dispersada con respecto a un ángulo medido desde el haz de luz transmitida. La intensidad con la que se produce este fenómeno está determinada principalmente por el tamaño de las partículas o gotas, la longitud de onda de la luz y la diferencia entre los índices de refracción de la fase dispersa y del dispersante.

En el caso de las emulsiones, la interacción de una onda electromagnética con las gotas se caracteriza mediante un patrón de dispersión, el cual representa la dependencia angular de la intensidad de luz que emerge de la emulsión. A través de teorías adecuadas, este patrón de dispersión puede dar información sobre la fracción volumétrica de la fase dispersa y la distribución de tamaño de partícula de las emulsiones. La interacción entre las ondas electromagnéticas y las gotas en la emulsión puede dividirse en tres regímenes, de acuerdo con la relación entre el radio de las gotas (R) y la longitud de onda de la radiación incidente (λ):

régimen de longitud de onda larga ($R < \lambda/20$), régimen de longitud de onda intermedia ($R \approx \lambda/20$) y régimen de longitud de onda corta ($R > \lambda/20$).

Las emulsiones alimentarias contienen gotas cuyo tamaño están en el régimen de longitud de onda intermedio. En este caso, el patrón de dispersión es extremadamente complejo, porque las ondas de luz dispersadas por distintas partes de la misma gota están fuera de fase y por lo tanto pueden interferirse entre sí de manera constructiva o destructiva. La teoría de Mie fue desarrollada para interpretar patrones de dispersión de emulsiones o dispersiones diluidas que contienen partículas esféricas independientemente de su tamaño. Esta teoría asume que las ondas de luz son dispersadas por una partícula por única vez, de manera que puede aplicarse solo en sistemas diluidos ($\phi < 0,05$). En emulsiones y dispersiones más concentradas, el haz de luz dispersado por una gota interactúa inmediatamente con otra

La dispersión de la luz por parte de las emulsiones está estrictamente ligada con su apariencia. La intensidad de luz dispersada es mayor cuando la longitud de onda de la luz incidente está en el mismo orden que el tamaño de las gotas y cuando la diferencia de índices de refracción entre las fases continua y dispersa es mínima. Por tal motivo, la mayoría de las emulsiones alimentarias tienen una apariencia opaca, mientras que las nano emulsiones, al tener un tamaño de gota que cae dentro de un régimen de longitud de onda larga ($R < \lambda/20$) dispersan la luz con menor intensidad y por ende, son emulsiones translúcidas (McClements, 2016).

VI.I.I.I. Distribución de tamaño de partícula

Para el análisis del tamaño de partícula de las emulsiones alimentarias es conveniente referirse en términos de una distribución de tamaño de partícula. En una emulsión monodispersa este concepto carece de sentido, dado que el tamaño de las gotas esféricas puede caracterizarse de manera completa e inequívoca a través de un solo parámetro, el radio (R) o el diámetro (D) de las mismas. Las emulsiones alimentarias, en cambio, son polidispersas y requieren un análisis más detallado y complejo. Dado que el diámetro de las gotas está siempre comprendido entre un valor mínimo y un máximo, es conveniente dividir la escala de tamaños en varios rangos más pequeños y discretos, detallando el número de gotas que entran dentro de cada rango. Los resultados pueden presentarse en forma tabular o mediante un histograma. En la práctica es más conveniente e informativo presentar los datos como una frecuencia de tamaños en número, en superficie o en volumen (Rawle, 2005):

$$f_n = \frac{n_i}{N} \quad (6)$$

$$f_s = \frac{s_i}{S} \quad (7)$$

$$f_v = \frac{v_i}{V} \quad (8)$$

n_i , s_i y v_i son el número, área y volumen de las gotas del i -ésimo rango; N es el número total de gotas, S es el área superficial total creada durante el proceso de homogeneización y V es el volumen total de las gotas en la emulsión.

La distribución de tamaño de partícula también puede representarse como una curva continua: la función de distribución $F(D_i)$. La función de distribución en número se genera de manera tal que el área bajo la curva en el rango de dos diámetros D_i y $D_i + dD_i$ es igual al número de partículas en dicho rango, n_i , de manera tal que $n_i = F(D_i) \cdot dD_i$. A partir del mismo razonamiento pueden generarse las correspondientes funciones de distribución en superficie y en volumen. Asumiendo que las emulsiones están formadas por gotas esféricas, las funciones de distribución en número, $F_n(D_i)$, superficie, $F_s(D_i)$ y volumen, $F_v(D_i)$ pueden relacionarse entre sí a partir de las siguientes expresiones (Rawle, 2005):

$$F_v(D_i) = \frac{1}{6} \cdot \pi \cdot D_i^3 \cdot F_n(D_i) \quad (9)$$

$$F_s(D_i) = \pi \cdot D_i^2 \cdot F_n(D_i) \quad (10)$$

Las funciones de distribución son monomodales cuando presentan un único pico, bimodales cuando presentan dos picos principales o multimodales si hay más de dos picos. En general, la complejidad de las funciones de distribución hace imposible la descripción mediante un modelo matemático sencillo. En algunos casos, cuando las funciones de distribución son monomodales, se puede hacer un modelado mediante una función de distribución normal o gaussiana o una función de distribución normal logarítmica (McClements, 2016). La Figura 15 muestra un ejemplo de distribuciones en número, superficie y volumen para una emulsión O/W.

A partir de las funciones de distribución pueden calcularse distintos diámetros promedio, que brindan información complementaria (Tabla 6). La determinación de los

diámetros promedio $D_{1,0}$ (en número), $D_{2,0}$ (en superficie) y $D_{3,0}$ (en volumen) requieren el conocimiento del número total de gotas. Se puede prescindir de dicho dato mediante la utilización del diámetro promedio de Sauter ($D_{3,2}$) y del diámetro promedio de De Brouckere ($D_{4,3}$), cuyas fórmulas no contienen el número total de gotas. $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ se relacionan con las distribuciones en superficie y volumen, respectivamente. Estos diámetros se conocen como “*moment diameters*” e introducen otro término lineal en el diámetro, de manera que en el numerador el término superficial tiene una dependencia con D^3 y el volumen con D^4 (Walstra, 1983; Rawle, 2005).

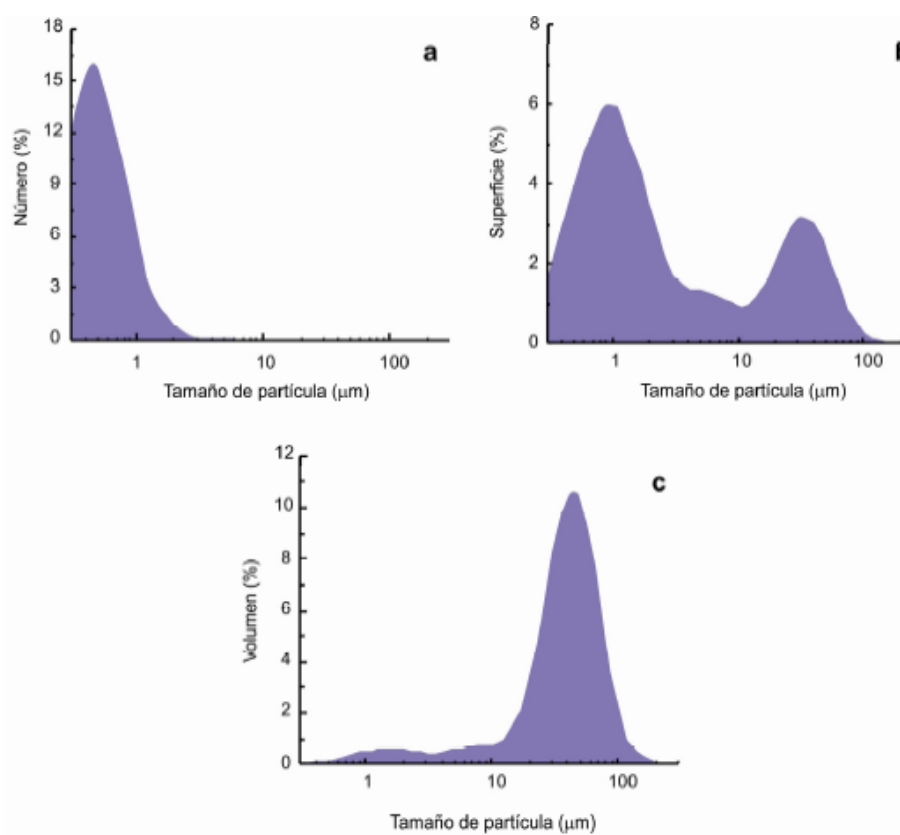


Figura 15: Distribuciones de tamaño de partícula para una emulsión aceite en agua (O/W): **a)** distribución en número; **b)** distribución en superficie; **c)** distribución en volumen. Adaptado de Márquez, (2009).

Además de los diámetros promedio, existen otros parámetros que pueden obtenerse a partir de la distribución de tamaño de partícula. La moda es el valor más alto de la función de distribución y por ende, el que tiene mayor frecuencia (Rawle, 2005). Para el análisis de los resultados en emulsiones que exhiben una distribución de tamaño de partícula bimodal o multimodal (Figuras 15 b y c), se puede asignar una moda a cada pico. Además, las

dispersiones o emulsiones también pueden caracterizarse mediante los percentiles ($D_{a,b}$) donde $a = n, s$ o v , dependiendo si la distribución es en número, superficie o volumen, respectivamente; b es un número cualquiera comprendido entre 0 y 1. El percentil 0,5 ($D_{a,0,5}$) es el más común y se denomina mediana de la distribución. La mediana es el valor de diámetro de partícula que divide a la población de gotas de la emulsión en dos partes iguales, es decir 50 % por encima y 50 % por debajo. Los percentiles 0,1 (10 %) y 0,9 (90 %) también son ampliamente utilizados. La interpretación de los percentiles permite obtener información complementaria valiosa sobre las emulsiones o dispersiones en las condiciones de medición. Por ejemplo, si $D_{v0,1} = 1,0 \mu\text{m}$, significa que el 10% del volumen total de la fase dispersa se distribuye en partículas menores a $1,0 \mu\text{m}$; si $D_{s0,9} = 20 \mu\text{m}$ significa que el 90% del área creada se distribuye en partículas de diámetro inferior a $20 \mu\text{m}$; finalmente, si $D_{n0,9} = 0,5 \mu\text{m}$, significa que el 90% de las partículas tienen un diámetro inferior a $0,5 \mu\text{m}$. Cabe destacar que sólo cuando las funciones de distribución son monomodales y se ajustan exactamente a una distribución normal o gaussiana, hay una coincidencia entre el diámetro promedio (por ejemplo, $D_{4,3}$ en una distribución en volumen), la moda y la mediana ($D_{a0,5}$), caso contrario, estos valores serán diferentes (Rawle, 2005). En emulsiones o dispersiones que exhiben una distribución de partícula multimodal, la caracterización adecuada requiere el empleo de al menos, dos parámetros diferentes junto a la distribución propiamente dicha (McClements, 2016).

Tabla 6: Definición matemática de los diámetros promedio más utilizados en emulsiones.

$$D_{1,0} = \frac{\sum n_i \times D_i}{\sum n_i} = \frac{\sum n_i \times D_i}{N}$$

$$D_{2,0} = \frac{\sum n_i \times D_i^2}{\sum n_i} = \frac{\sum n_i \times D_i^2}{N}$$

$$D_{3,0} = \frac{\sum n_i \times D_i^3}{\sum n_i} = \frac{\sum n_i \times D_i^3}{N}$$

$$D_{3,2} = \frac{\sum n_i \times D_i^3}{\sum n_i \times D_i^2}$$

$$D_{4,3} = \frac{\sum n_i \times D_i^4}{\sum n_i \times D_i^3}$$

La medición de la distribución de tamaño de partícula debe hacerse en condiciones de alta dilución ($\phi < 0,05$) y con agitación, para que las gotas se distribuyan de manera uniforme durante las mediciones. En las unidades de dispersión por vía húmeda, un pequeño volumen de emulsión se coloca en un recipiente con agua u otro agente dispersante hasta llegar a un valor adecuado de turbidez, se selecciona la velocidad de agitación en el émbolo agitador y al momento de la medición, un haz de radiación láser incide sobre una cubeta interna transparente por donde recircula la emulsión diluida. La luz dispersada en distintos ángulos por partículas de diferente tamaño pasa por un complejo sistema óptico e incide posteriormente sobre un arreglo de detectores obteniendo un patrón angular de luz dispersada. El *software* incorporado en el equipo, con el conocimiento previo del índice de refracción de la fase dispersa y del dispersante, se encarga de traducir el patrón angular de dispersión en la correspondiente distribución de tamaño de partícula (McClements, 2016). Además, las unidades de dispersión por vía húmeda también disponen de puntas sonicadoras que, mediante la aplicación de ondas de ultrasonido de baja intensidad, permiten disociar flóculos o agregados en emulsiones y dispersiones, respectivamente.

VI.I. II. Dispersión dinámica de luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz (DLS), también conocida como espectroscopía de correlación de fotones (PCS) y como dispersión de luz casi elástica (QELS), es una técnica no invasiva, que requiere poco volumen para el análisis de una muestra y se emplea para la medición del tamaño de partícula de sistemas que están por debajo del límite inferior de detección de las técnicas de SLS. Las aplicaciones más comunes de la técnica de DLS son las mediciones del tamaño de partícula de pequeñas gotas de emulsiones, proteínas y carbohidratos en solución y en dispersión, de agregados proteicos, de micelas y otros sistemas coloidales (McClements, 2016). Los instrumentos basados en este principio son capaces de analizar partículas con diámetros comprendidos entre 3 nm y 3 μ m.

El fundamento de este dispositivo se basa en que la muestra es iluminada con una fuente de luz láser a una determinada longitud de onda y la intensidad de la luz es dispersada en diferentes direcciones por las partículas. La luz dispersada es recibida por un detector óptico (Figura 16) y fluctúa en función de tiempo debido a movimiento browniano de la partícula y se relaciona con el tamaño de la misma. 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 traslacional (D), a partir del cual, es posible estimar el tamaño de partícula. La relación entre el tamaño de la partícula y el coeficiente de difusión traslacional se define por la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 11).

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (11)$$

En esta expresión, d_H es el diámetro hidrodinámico, D el coeficiente de difusión traslacional ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$), k la constante de Boltzmann ($1,38\cdot 10^{-23} \text{ N}\cdot\text{m}\cdot\text{K}^{-1}$), T la temperatura absoluta (K) y η la viscosidad ($\text{N}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$). El diámetro obtenido es el correspondiente a una esfera que posee el mismo coeficiente de difusión traslacional que el de la partícula. A partir de las velocidades de fluctuación en los patrones de intensidad de luz dispersada se obtiene la distribución del tamaño de partícula presente en la muestra. Las fluctuaciones rápidas de la intensidad de luz están asociadas a las partículas de menor tamaño.

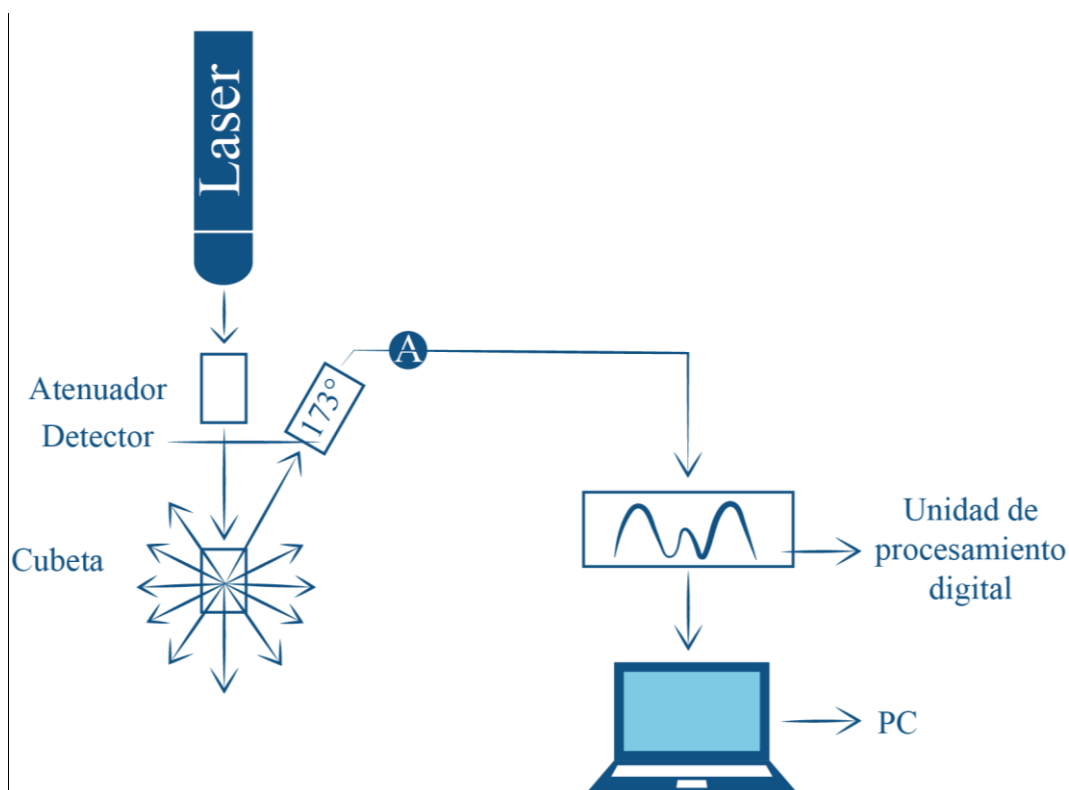


Figura 16: Representación esquemática del equipo DLS.

VI.I.III. Evaluación de la estabilidad global de una emulsión por medidas de dispersión múltiple de luz

Los analizadores verticales de barrido (Quick Scan[®], Turbiscan[®]) son dispositivos que permiten medir satisfactoriamente la desestabilización global de emulsiones, espumas y dispersiones coloidales concentradas (Mengual *et al.*, 1999; Sceni y Wagner, 2007; Palazolo *et al.*, 2005; K. Wang *et al.*, 2018). El equipo está conformado por un cabezal de detección que se desplaza verticalmente a lo largo de la celda cilíndrica de vidrio con fondo plano, donde la muestra se almacena durante el tiempo del ensayo. El cabezal dispone de una fuente de luz en el infrarrojo cercano ($\lambda = 850 \text{ nm}$), y dos detectores sincronizados (Figura 17). El detector de transmitancia detecta la luz o radiación transmitida a través de la muestra (con un ángulo de 0°), mientras que el detector de retrodispersión (*backscattering*) recibe la radiación dispersada por la muestra en una dirección de 135° respecto al haz de luz incidente (Mengual *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2002). El cabezal realiza un barrido a lo largo de la celda que contiene la muestra (entre 40 y 65 mm dependiendo del equipo empleado), recolectando los datos de transmitancia (T%) y *backscattering* (BS%) cada $40 \mu\text{m}$. A través del software asociado al

anализador, se pueden seleccionar distintos programas de barrido, que permiten la obtención de perfiles de T% y BS% a distintos tiempos de almacenamiento (Pan *et al.*, 2002).

El análisis de los perfiles de T% y BS % permite evaluar la cinética de los distintos mecanismos de desestabilización de emulsiones (por ejemplo, cremado y coalescencia) si se elige adecuadamente la zona del tubo (Palazolo *et al.*, 2004, 2005, Pan *et al.*, 2002). En este sentido, el BS% es el parámetro más utilizado y depende tanto de la fracción volumétrica (o másica) de la fase dispersa como del diámetro (D) de partículas, es decir $BS\% = f(\phi, D)$. El BS% se incrementa tanto con el aumento de ϕ (o ϕ_m) como la disminución de D. Un ejemplo típico de los cambios temporales de los perfiles de BS% debido a la desestabilización se muestra en la Figura 18. Si a medida que transcurre el tiempo el BS% disminuye en toda la longitud de la celda que contiene la emulsión, el resultado indica que hay un fenómeno de coalescencia. En este caso, ϕ permanece constante, por lo que el número de partículas disminuye a expensas de un incremento de su tamaño (Figura 18a). En cambio, si el BS% sólo disminuye en la parte inferior de la celda y el perfil se desplaza hacia la parte superior de la misma, el resultado es consistente con un proceso de cremado (Figura 18b). En este caso, la disminución de BS% en la parte inferior de la celda se atribuye a una disminución de ϕ ; al mismo tiempo, el aumento de BS% en la parte superior de la celda se atribuye a la formación de una emulsión más concentrada, la fase crema, de mayor ϕ . En sistemas reales, los procesos de cremado y coalescencia pueden ocurrir en forma simultánea, por lo que la variación temporal de los perfiles de BS% es más compleja.

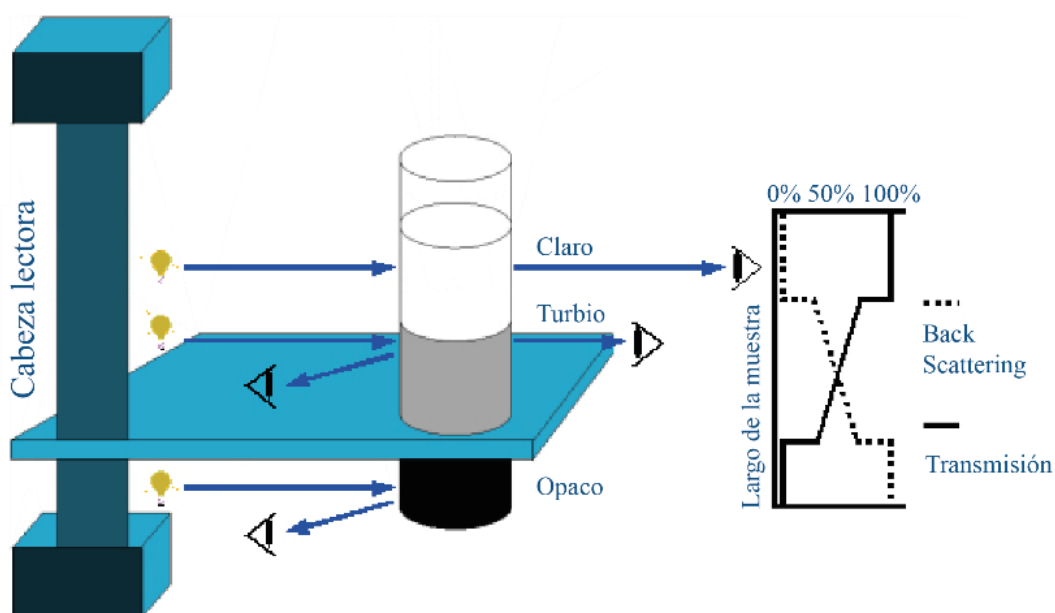


Figura 17: Esquema de un equipo Turbiscan.

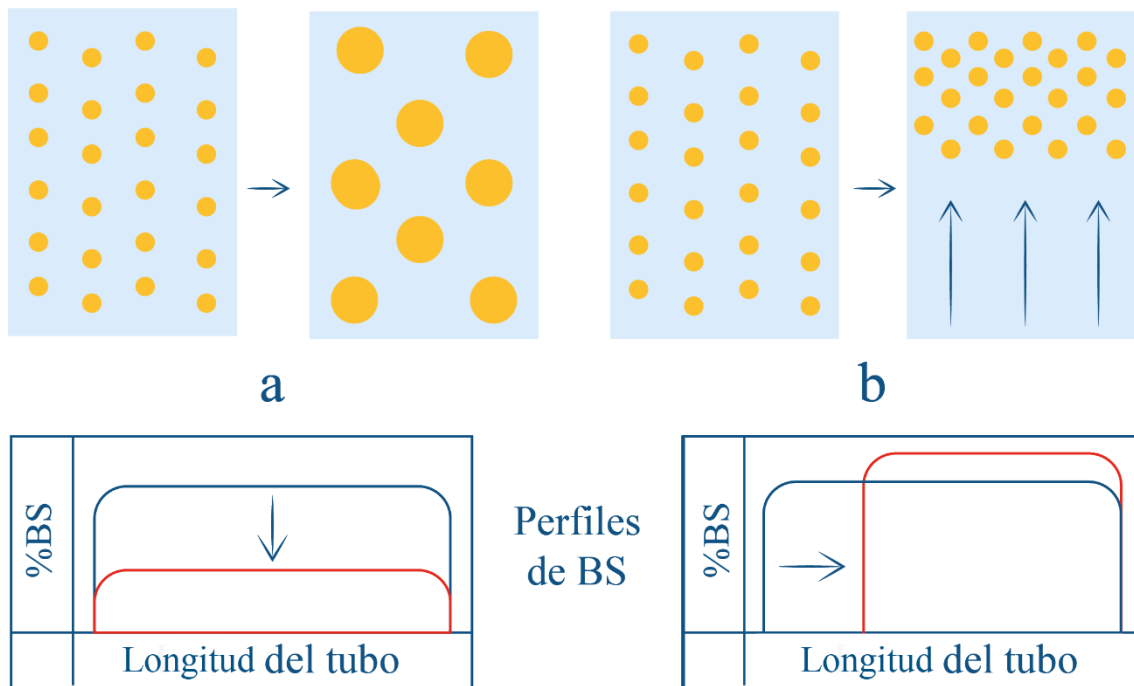


Figura 18: Representación esquemática de los cambios ocurridos en los procesos de **a)** coalescencia y **b)** cremado, y sus efectos en los perfiles de retrodispersión (*backscattering*).

VI.II. Determinación del potencial- ζ

Muchas de las propiedades relevantes de los sistemas coloidales están determinadas por la carga eléctrica (potencial) en las partículas, por lo tanto, la distribución del potencial eléctrico determina la energía de interacción entre partículas. En muchos casos la carga de las partículas es responsable de la estabilidad frente a la agregación, de procesos de sedimentación e indirectamente influyen en el comportamiento de flujo de la dispersión coloidal (Hunter, 2011).

La capa de líquido que rodea a la partícula tiene dos zonas: a) una región interna, conocida como capa de Stern, relativamente inmóvil donde la atracción entre los contra-iones y la superficie cargada es fuerte; y b) una región externa, conocida como capa difusa, donde la atracción es mucho más débil, presentando cierta movilidad (Evans y Wennerstrom, 1994). Esta distribución de iones alrededor de una partícula se conoce habitualmente como doble capa eléctrica (Figura 19).

Cuando una partícula se desplaza por efecto de la gravedad, lo hace con los iones que conforman la capa de Stern y la capa difusa, pero los iones que se encuentran por fuera del límite no se mueven con la partícula, este límite teórico es conocido como plano de deslizamiento (*shear plane*). El potencial que existe en este límite se conoce como potencial $-\zeta$ (Figura 19) y su magnitud es un indicador de la estabilidad del sistema coloidal en estudio (Malvern Instruments Ltd., 2013).

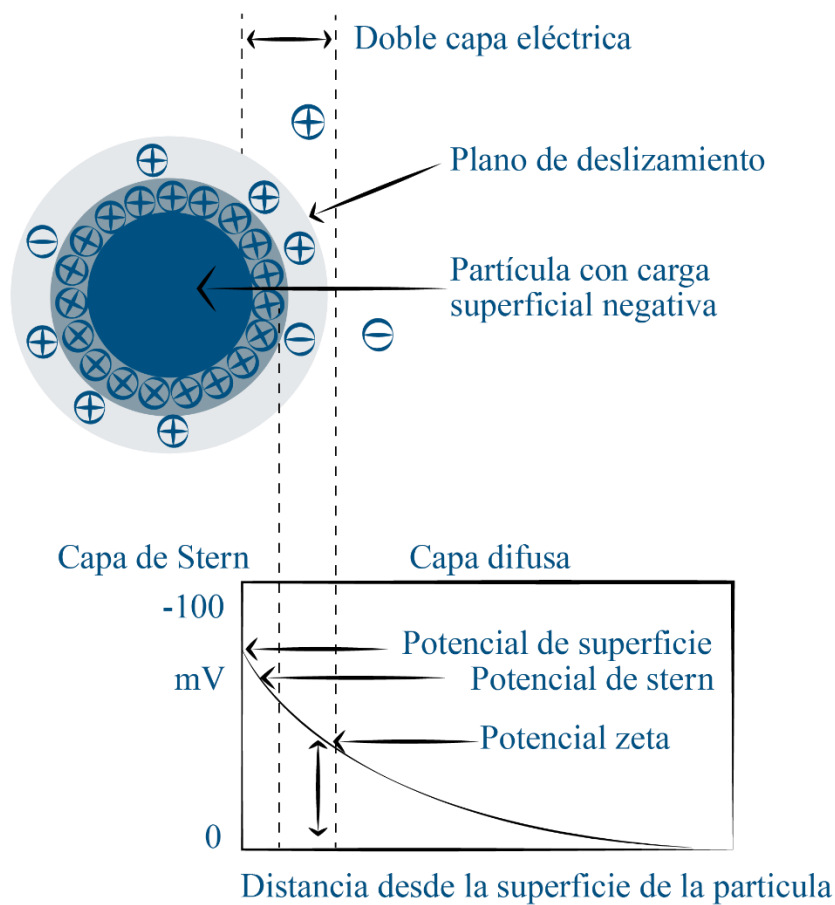


Figura 19: Esquema de la distribución de iones positivos alrededor de una partícula negativa y de la doble capa que la rodea.

Si la magnitud del potencial- ζ de las partículas en dispersión exhiben valores entre + 30 mV y -30 mV, tenderán a repelerse entre sí y las dispersiones se consideran estables. En este caso, la magnitud de la repulsión electrostática predomina sobre las demás interacciones coloidales. El pH es uno de los factores que más afecta a la carga de las partículas en dispersión y por ende al valor del potencial- ζ (Hunter, 2011).

VI.IV. Reología

El termino reología fue propuesto por Bingham Lafayette, conociéndose como la ciencia que estudia la deformación y flujo de los materiales. Según Muller (1973) la reología es la ciencia que estudia la deformación de un material bajo la influencia de un esfuerzo. Algunas de las características sensoriales de las emulsiones son atribuidas a sus propiedades reológicas. La estabilidad y vida útil depende de las características reológicas de la fase continua. Debido a que las emulsiones son sistemas dispersos complejos por su composición y propiedades físicas, exhiben diversos comportamiento reológicos, desde fluidos de baja viscosidad (leche), hasta sólidos con elevada dureza (margarinas) (McClements, 2016).

VI.IV.I. Viscosidad de flujo estacionario

El concepto de viscosidad fue introducido por Newton cuando en su obra "*Philosophiae Naturalis Principia Mathematica*" afirmó que la resistencia ejercida, que surge a partir de una falta en el deslizamiento de un fluido, es proporcional a la velocidad a la que las partes de un fluido son separadas entre sí. En términos generales, en los fluidos newtonianos la viscosidad es constante, es decir que son aquellos fluidos no estructurados, compuestos por moléculas simples, con un comportamiento puramente viscoso el cual puede ser descrito, en todo el rango del gradiente de medición, mediante la Ley de Newton (Ecuación 12) y su viscosidad sólo depende de la presión y la temperatura.

$$\tau = \mu \frac{d\gamma}{dt} \quad (12)$$

τ el esfuerzo por unidad de área o esfuerzo de cizalla, μ es el coeficiente de viscosidad y $d\gamma/dt$ el gradiente de velocidad, también llamado velocidad de deformación. Por lo tanto, el esfuerzo de corte (τ) es igual a la velocidad de deformación multiplicada por el coeficiente de viscosidad y la viscosidad es independiente de dicha velocidad (McClements, 2005; Ramírez, 2006).

Hay una gran variedad de fluidos cuyo comportamiento no se ajusta al de un líquido newtoniano, al menos en un cierto rango de esfuerzo (Rohn, 1995). Estos fluidos suelen ser sistemas dispersos (emulsiones, suspensiones, entre otros), soluciones de macromoléculas (fluidos biológicos), biopolímeros o materiales fundidos (plásticos) con un cierto grado de

estructuración. Para diferenciar un fluido newtoniano de uno de carácter no newtoniano, al aplicar un esfuerzo esta deformación su viscosidad no permanece constante y esta varía con el gradiente de velocidad. El concepto de viscosidad como propiedad intrínseca desaparece y se incorpora el concepto de viscosidad aparente (η_{ap}). En los fluidos no newtonianos, la relación entre el esfuerzo y la velocidad de corte no es lineal, exhibiendo diversos comportamientos tal como se presenta en la Figura 20 (Fischer y Windhab, 2011).

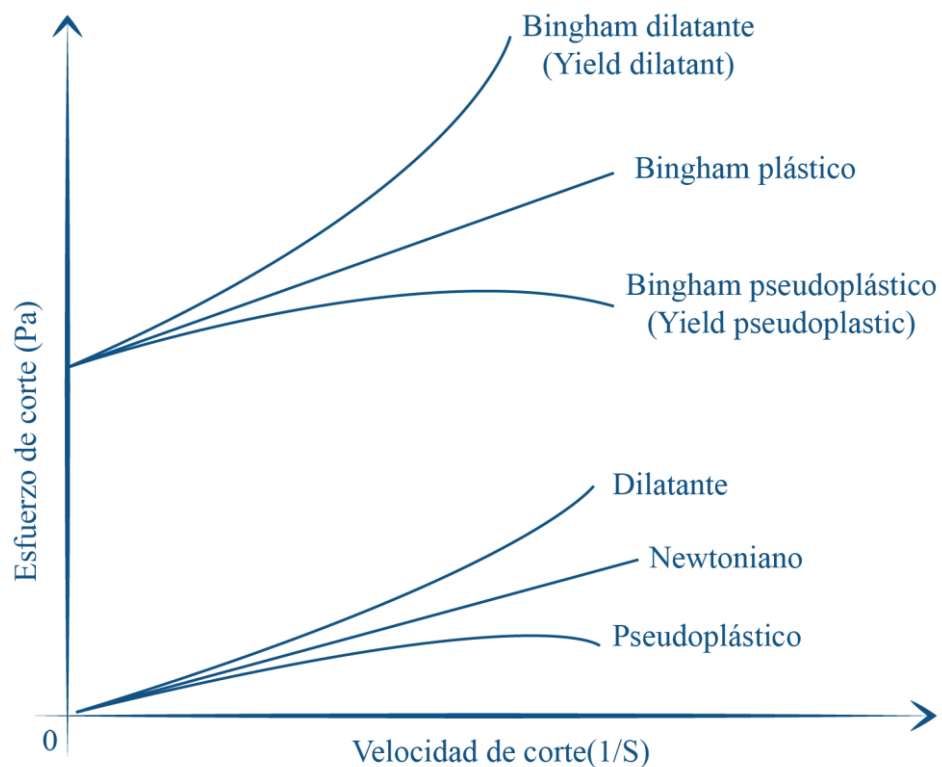


Figura 20: Curvas de flujo características de fluidos newtonianos y no newtonianos en condiciones de flujo.

Los fluidos con comportamiento no lineal dependientes de la velocidad de cizallamiento son:

(i). Fluidos plásticos: La plasticidad es un fenómeno que muestran ciertos materiales que se comportan como sólidos elásticos, almacenando una cierta cantidad de energía cuando son sometidos a esfuerzos menores que cierto valor umbral llamado umbral de fluencia; mientras que con un esfuerzo superior al umbral se deforman continuamente como un fluido, siendo el

esfuerzo una función, lineal o no, de la velocidad de deformación. Ejemplos típicos de este tipo de materiales son la pasta dentífrica, mayonesa, mermelada, entre otros.

(ii). Fluidos pseudoplásticos: El comportamiento pseudoplástico se manifiesta con la reducción en la viscosidad aparente de un fluido al incrementarse la velocidad de cizallamiento. Muchos materiales muestran este tipo de comportamiento en mayor o menor grado y es el comportamiento más común. Así, por ejemplo, numerosas emulsiones, suspensiones, dispersiones o disoluciones de polímeros y polímeros fundidos son casos de este tipo de fluidos.

(iii). Fluidos dilatantes: Son aquellos fluidos que incrementan la viscosidad aparente al incrementar la velocidad de cizallamiento aplicada, lo cual es causado por reorganizaciones en su microestructura. Algunos de los sistemas que siguen este comportamiento son dispersiones de almidón y ciertas dispersiones de policloruro de vinilo.

En algunas emulsiones su viscosidad aparente incrementa o disminuye en función del tiempo durante la aplicación de un esfuerzo cortante. En algunos casos, este cambio es reversible y el fluido recupera sus características reológicas originales si se deja en reposo durante un periodo suficientemente largo. En otros casos, el cambio producido por cizallamiento de la muestra es irreversible, y la muestra no recupera sus características originales.

Estos fluidos se clasifican en:

- a) Reopécticos:** Su viscosidad aparente incrementa en función del tiempo al ser sometido a una velocidad de cizallamiento constante. Algunos ejemplos de estos fluidos incluyen pastas de yesos y tintas de impresora.
- b) Tixotrópicos:** La viscosidad aparente disminuye con el tiempo al ser sometidos a una velocidad de corte constante. Ejemplos de estos fluidos son pastas de almidón, gelatinas, mayonesas, pinturas, entre otros. En la Figura 21 se puede observar el efecto de la tixotropía en un sistema. En la curva de flujo aparece el típico ciclo de histéresis, denominado ciclo de tixotropía, al medirse una mayor viscosidad durante una primera medida cuando se aplica cizalla, y luego durante la segunda medida, se

observa una reducción de la viscosidad al disminuir paulatinamente la velocidad de corte o cizalla. Experimentalmente es difícil detectar diferencias entre la pseudoplasticidad o la tixotropía ya que los efectos combinados de la cizalla y el tiempo pueden superponerse durante una medida, con el inconveniente añadido de que la mayoría de los fluidos tixotrópicos son pseudoplásticos (Lequeux, 1998; Martínez, 2006; McClements 2016)

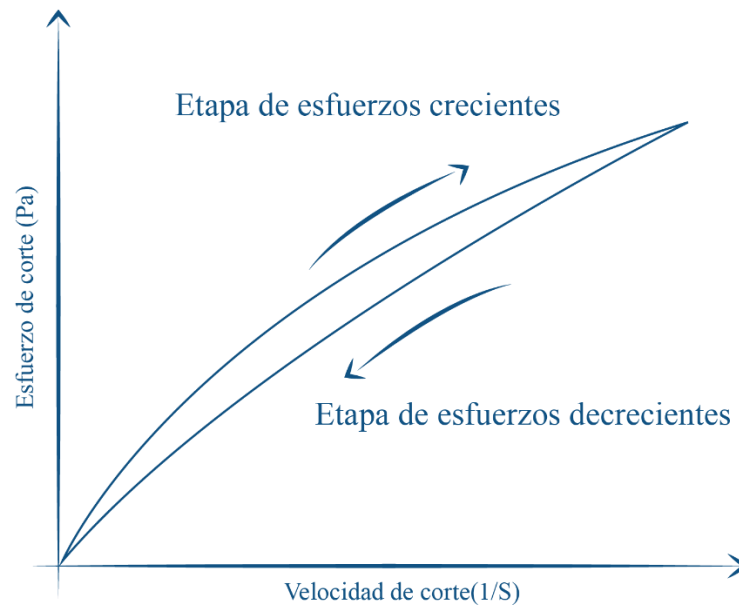


Figura 21: Ciclo de histéresis observado para un fluido tixotrópico

VI.IV. II. Reología Interfacial

En la interfase entre dos líquidos inmiscibles o entre un líquido y un gas, existe una fase bidimensional que exhiben propiedades reológicas distintas de las que tienen ambas fases por separado. Por lo tanto la reología interfacial estudia las respuestas mecánicas y de flujo de una fase bidimensional o una interfase fluida (Krägel *et al.*, 2008). El equilibrio y las propiedades dinámicas de la adsorción de surfactante son responsables del comportamiento mecánico de las interfases, determinando su evolución y las características viscoelásticas. En estos ensayos las propiedades reológicas son dependientes de la deformación a la cual se han sometido las películas interfaciales: corte o dilatación. Las primeras se obtienen a una frecuencia fija al someter la película a esfuerzos que originan distorsiones de su forma manteniendo su tamaño,

en cambio, las propiedades dilataciones manifiestan la respuesta de la interfase a compresiones y expansiones que modifican su tamaño, pero no su forma (Figura 22) (Ravera *et al.*, 2005)

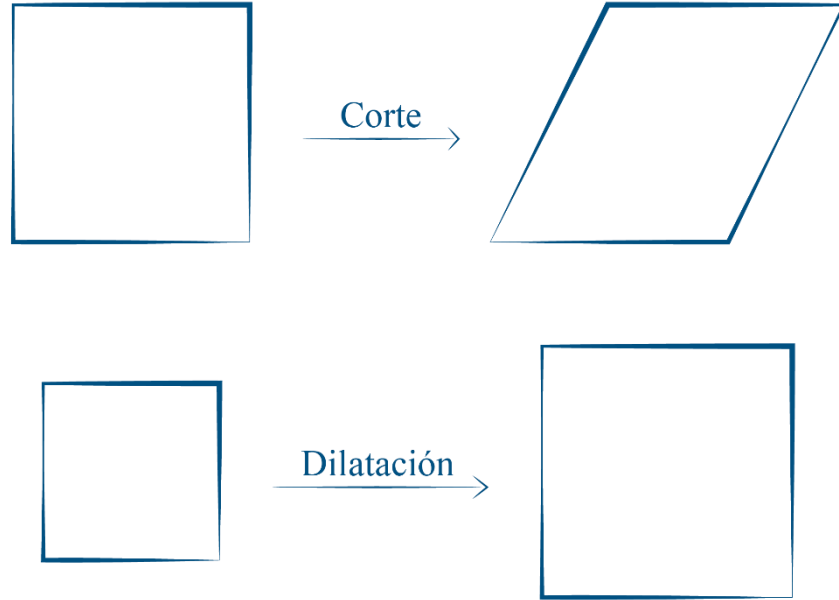


Figura 22: Representación de los tipos de deformación en interfase bidimensional para medidas de reología interfacial

En nuestro trabajo la reología interfacial se determinó por ensayos de reología oscilatoria de corte, evaluando el comportamiento viscoelástico de las membranas interfaciales mediante pruebas dinámicas, donde la muestra es sometida a movimientos oscilatorios. En este caso, se aplica un esfuerzo sinusoidal a un material y la respuesta de la medición también es de carácter sinusoidal, aunque estos ensayos también se pueden realizar al bulk de sistema dispersos (Figura 23). El ensayo dinámico permite separar el esfuerzo debido a la deformación sinusoidalmente variable en sus componentes viscoso y elástico (Sharman *et al.*, 2003).

El comportamiento elástico de un material se puede representar por un resorte que sigue la ley de Hooke (ecuación 13), y el viscoso por un amortiguador que sigue la ley de Newton (ecuación 14):

$$\tau_E = G\gamma_E \quad (13)$$

donde τ_E es el esfuerzo de corte, γ_E la deformación y G un módulo constante del resorte.

$$\tau_V = \eta \dot{\gamma}_V \quad (14)$$

Siendo τ_v es el esfuerzo de corte, $\bar{u}_v$ la velocidad de corte y η la viscosidad.

Cuando se somete la muestra a una deformación oscilatoria, la expresión para dicha deformación puede escribirse como:

$$\gamma = \gamma_0 \text{Sen}(\omega t) \quad (15)$$

donde γ_0 es la deformación máxima o amplitud, ω la frecuencia de oscilación angular y t el tiempo. Si se reemplaza la ecuación 15 en la 13, se obtiene para el esfuerzo de corte resultante que actúa sobre el resorte, una función seno (16), indicando que la deformación aplicada y el esfuerzo de corte elástico se encuentran en fase.

$$\tau_E = G\gamma_0 \text{sen}(\omega t) \quad (16)$$

Derivando la ecuación 15 respecto del tiempo y reemplazando en la ecuación 14 se obtiene una función coseno para el esfuerzo de corte viscoso (17) que se encuentra 90° fuera de fase con respecto a la deformación aplicada.

$$\tau_v = \eta\omega\gamma_0 \cos(\omega t) \quad (17)$$

Observando las ecuaciones 16 y 17 se encuentra que la diferencia de fase entre la deformación aplicada y el esfuerzo de corte de respuesta indica cuán viscoelástica es la muestra. Si la diferencia de fase es 0° el material es puramente elástico, si es 90° es puramente viscoso y si está entre 0° y 90° es viscoelástico (Schramm, 1994).

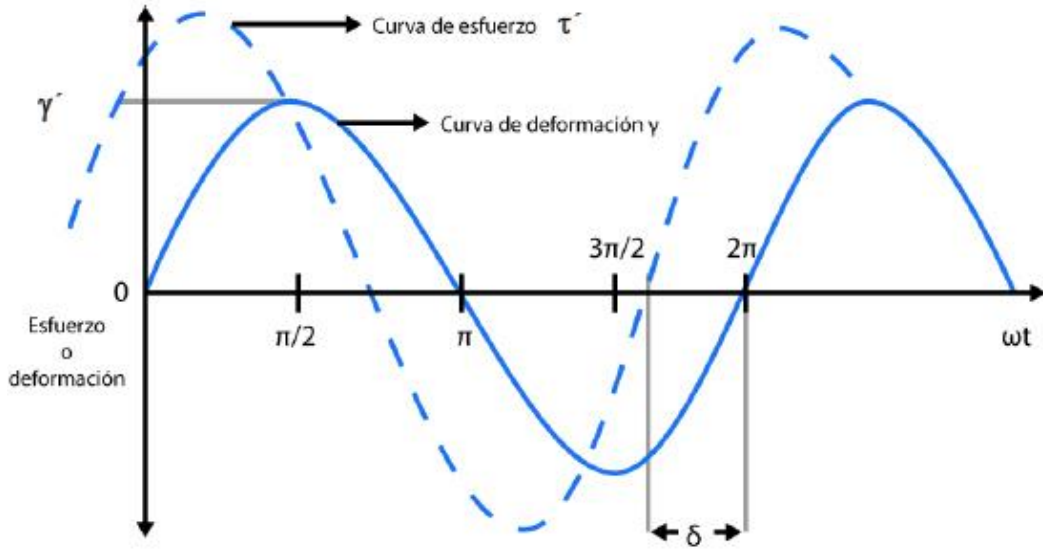


Figura 23: Representación esquemática de la deformación que varía de manera sinusoidal en una prueba dinámica representativa.

El esfuerzo de corte resultante τ en general está desfasado de la deformación aplicada por un ángulo δ y puede escribirse como:

$$\tau = \tau_0 \cdot \text{sen}(\omega \cdot t + \delta) \quad (18)$$

donde δ es la diferencia de fase y τ_0 la amplitud del esfuerzo de corte. Expandiendo la ecuación anterior trigonométricamente, se obtiene:

$$\tau = \tau_0 \cdot [\cos \delta \cdot \text{sen}(\omega \cdot t) + \text{sen} \delta \cdot \cos(\omega \cdot t)] \quad (19)$$

Esta expresión contiene tanto la contribución elástica como la viscosa. La relación entre la amplitud del esfuerzo de corte y la deformación máxima se denomina módulo complejo (G^*):

$$G^* = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \quad (20)$$

Este parámetro es una medida de la resistencia total del material a la deformación aplicada. La energía almacenada durante la deformación está representada por el módulo

elástico o de almacenamiento (G'), mientras que la energía disipada en el elemento viscoso está representada por el módulo viscoso o de pérdida (G''):

$$G' = G^* \cdot \cos \delta \quad (21)$$

$$G'' = G^* \cdot \sin \delta \quad (22)$$

Si la muestra es puramente elástica, $\delta = 0^\circ$, $G' = G^*$ y $G'' = 0$. Si la muestra es puramente viscosa, $\delta = 90^\circ$, $G'' = G^*$ y $G' = 0$.

El módulo complejo se relaciona con G' y G'' a través de la siguiente ecuación:

$$G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad (23)$$

Como función alternativa al módulo complejo, se define la viscosidad compleja (η^*) como:

$$\eta^* = \frac{G^*}{\omega} = \frac{\tau_0}{\gamma_0 \cdot \omega} \quad (24)$$

Este parámetro es una medida de la magnitud de la resistencia total de la muestra al esfuerzo de corte dinámico. Otra función que se usa habitualmente para describir el comportamiento viscoelástico de un material es la tangente del ángulo de desfase. La misma es proporcional a la energía disipada / energía almacenada por ciclo.

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (25)$$

Por simplicidad, los resultados experimentales de las medidas dinámicas se expresan frecuentemente en términos de G' , G'' , $\tan \delta$ o η^* como función de la temperatura a una frecuencia constante o como función de la frecuencia a una temperatura constante (Schramm, 1994)

VII.OBJETIVOS.

VII.I. Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo fue la obtención de emulsiones aceite en agua (O/W) preparadas con concentrados de suero de soja (CSS) y de tofu (CST) en el rango de pH de interés alimenticio con alta estabilidad frente a tratamientos de estrés tecnológico como la congelación y la agitación mecánica.

VII.II. Objetivos específicos

- Obtener concentrados de suero de soja y tofu a partir de sueros de soja (SS) preparados en el laboratorio y suero de tofu (ST) industrial, respectivamente y estudiar el efecto de las condiciones de procesamiento durante la obtención de los mismos.
- Determinar en los concentrados proteicos de suero de soja y tofu obtenidos, su composición química, la solubilidad acuosa de proteínas y polisacáridos y el aporte a la turbidez a distintos pH, el grado de glicosilación, la composición polipeptídica y la estabilidad térmica.
- Estudiar las propiedades interfaciales (tensión interfacial/superficial de equilibrio y reología interfacial/superficial) y las propiedades funcionales de superficie (emulsificación y espumado) de los CSS y CST, evaluando la influencia del pH (2,0 a 7,0)
- Analizar la formación y estabilización de las emulsiones aceite en agua (o/w), empleando las dispersiones acuosas de CSS y CST (pH 3,0 a 5,0) a través de técnicas de dispersión de luz, reología, microestructura y determinación de la concentración proteica interfacial

- Evaluar la interacción de los concentrados de suero de soja con polisacáridos solubles de soja (SSPS) mediante técnicas espectrofotométricas, dispersión dinámica de luz y su comportamiento interfacial.
- Obtener emulsiones O/W ácidas con sistemas mixtos CSS/SSPS empleando distintas estrategias de complejación a pH 3,0 y evaluar la estabilidad frente al almacenamiento estacionario, congelación-descongelación y agitación mecánica controlada.

CAPÍTULO 1

Caracterización fisicoquímica y evaluación de las propiedades superficiales y espumantes de los concentrados de suero de tofu.

1.1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1.1. Materiales

El suero de tofu (ST, pH $5,6 \pm 0,1$ y densidad, δ : $1,057 \pm 0,003$ mg/mL a 25 °C) proveniente de la elaboración industrial del tofu, fue donado por Soyana S.H. (San Martín, Buenos Aires, Argentina). El ST se conservó en una cámara refrigerada a $4,0 \pm 0,1$ °C con agregado de azida de sodio (NaN_3 , 0,03% P/v) como agente antimicrobiano. Antes de su procesamiento (sección 1.2), el ST se filtró con una malla de algodón (Tyler 48 Mesh, 0,297 mm de apertura de poro) para eliminar las partículas de tofu coaguladas en suspensión.

La albúmina sérica bovina (BSA, 99% de pureza y libre de ácidos grasos), el *o*-ftalaldehído (OPA), la N-acetilcisteína (NAC), los reactivos y marcadores de peso molecular para electroforesis (sección 1.11.1) fueron adquiridos a Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, EE. UU.). Todos los demás reactivos de grado analítico se adquirieron a Anedra (Research AG; Buenos Aires, Argentina) y Cicarelli Laboratorios (Reagents S.A.; San Lorenzo, Santa Fe, Argentina).

1.1.2. Preparación de los concentrados de suero de tofu

El ST filtrado se concentró empleando un evaporador rotatorio (Heidolph OB Lavorota 4000, Heidolph, Instruments, GmbH & Co.KG; Schwabach, Alemania) en volúmenes de 1 L por proceso, a tres combinaciones diferentes de presión y temperatura: $50,0 \pm 2,0$ °C (8,0 kPa), $65,0 \pm 2,0$ °C (16,0 kPa) y $80,0 \pm 2,0$ °C (24,0 kPa). El volumen inicial del ST se redujo hasta un 80% durante la etapa de concentración y el tiempo aproximado de procesamiento fue de 120 min. Para cada condición seleccionada de presión y temperatura se procesó un total de 5 L de ST filtrado. Los sueros concentrados resultantes se dializaron frente a agua destilada durante 48 h y a 4 °C con 3 intercambios de agua diarios, empleando una membrana de diálisis con un *cut off* de 3,5 KDa (Snake Skin, Thermo Scientific; Rockford, Illinois, EE. UU.). Los líquidos dializados obtenidos se agruparon y finalmente se liofilizaron (-45 °C, 2,0 Pa, 85 h, liofilizador LI-2E260, Rificor SA; Buenos Aires, Argentina). En función de la temperatura empleada en la etapa de concentración, los concentrados obtenidos se denominaron CST50, CST65 y CST80, respectivamente.

Además, se prepararon concentrados a partir de ST filtrado y con pH ajustado a 7,0 con NaOH 1,0 M. La concentración se realizó a dos combinaciones diferentes de temperatura y presión: $50,0 \pm 2,0$ °C (8,0 kPa) y $80,0 \pm 2,0$ °C (24,0 kPa). Los líquidos resultantes concentrados se procesaron en las condiciones mencionadas anteriormente, obteniéndose las muestras CST50_{aj} y CST80_{aj}.

El rendimiento porcentual (R, % P/P) en la obtención de los concentrados se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$R (\% P/P) = \left(\frac{M_{CST}}{M_{ST}} \right) \cdot 100 \quad (26)$$

M_{CST} y M_{ST} son las masas del concentrado y del ST de partida, respectivamente.

1.1.3. Determinación de densidad

La densidad del ST de partida previamente filtrado (sección 1.1.1) y las dispersiones acuosas de los concentrados, se determinó a 25 °C empleando un picnómetro de 50 mL provisto de un capilar. La densidad se calculó a partir de las masas del picnómetro con agua bidestilada (M_{agua}), con la muestra (M_m) y la densidad del agua (δ_{agua}) a 25 °C (0,99707 g/mL):

$$\delta_m = \left(\frac{M_m}{M_{agua}} \right) \cdot \delta_{agua} \quad (27)$$

Los valores obtenidos de la densidad se utilizaron para la conversión de los parámetros de composición química del ST de % P/P a g/L.

1.1.4. Determinación de extracto seco

El extracto seco del ST de partida previamente filtrado (sección 1.1) se determinó por el método gravimétrico tradicional de secado en estufa a presión atmosférica normal. Las muestras (1,000 g) se colocaron en placas de Petri (10 cm de diámetro) y se llevaron a una estufa de circulación forzada de aire a $103,0 \pm 1,0$ °C hasta peso constante (~3 h). Las muestras secas se enfriaron hasta temperatura ambiente en un desecador de vacío provisto con sílica gel. El extracto seco (ES, % P/P) se calculó como:

$$\text{ES (\% P/P)} = \left[\frac{(M_3 - M_1)}{(M_2 - M_1)} \right] \cdot 100 \quad (28)$$

M_1 es la masa de la placa de Petri vacía, en gramos; M_2 y M_3 son las masas, en gramos, de la placa más la muestra antes y después del secado, respectivamente.

1.1.5. Determinación de cenizas

El contenido de cenizas del suero de partida y de los concentrados se determinó por el método gravimétrico tradicional de calcinación por vía seca. Se pesó 500 mg de muestra en un crisol de porcelana y la calcinación se inició por calentamiento suave hasta residuos carbonosos. Luego, el tratamiento oxidativo se completó en una mufla convencional a 550 ± 10 °C durante 24 h. Las cenizas obtenidas se enfriaron hasta temperatura ambiente en un desecador de vacío provisto con sílica gel activa. El porcentaje de cenizas (P/P) se calculó como:

$$\text{Cenizas (\% P/P)} = \left[\frac{(M_3 - M_1)}{(M_2 - M_1)} \right] \cdot 100 \quad (29)$$

M_1 es la masa del crisol vacío, en gramos; M_2 y M_3 son las masas, en gramos, del crisol más la muestra antes y después de la calcinación, respectivamente.

1.1.6. Determinación del contenido de calcio total

El contenido de calcio total en el ST y los concentrados se determinó empleando las cenizas obtenidas según el procedimiento experimental descripto en la sección 1.1.5. Las cenizas se disolvieron en 10 mL de HCl 0,2 M, bajo agitación magnética suave. Sobre las soluciones resultantes, diluidas en agua bidestilada (1:50 V/V), se determinó el contenido de calcio por el método espectrofotométrico de *o*-cresoltaleín complexona (Morin, 1974), utilizando un kit comercial (Ca-Color AA, Wiener Lab.; Rosario, Santa Fe, Argentina). Los procedimientos de calibración se realizaron empleando las soluciones estándar de calcio incluidas en el *kit* comercial, de acuerdo con las instrucciones dadas por el proveedor. El contenido de calcio total se expresó en % P/P sobre la muestra.

1.1.7. Determinación de nitrógeno total y proteína bruta

1.1.7.1. Método de Kjeldahl

El contenido de proteína bruta de los concentrados y del ST de partida se determinó por el método de Kjeldahl ($N \times 6,25$) (método 920.87, AOAC, 1997). Para la etapa de digestión se pesó 0,5 g de muestra y se colocó en un balón de Kjeldahl de 500 mL. Posteriormente se adicionó 11 g de la mezcla catalizadora ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$ y K_2SO_4 en una relación 10:1 P/P) y 20 mL de H_2SO_4 concentrado (98% P/P , $\delta = 1,84$ g/mL). La digestión se realizó hasta mineralización completa y la solución ácida resultante se enfrió hasta temperatura ambiente. Luego se agregó 200 mL de agua destilada y el balón se transfirió a la unidad de destilación, donde se agregó NaOH 40% P/P hasta alcalinidad neta. El NH_3 liberado y destilado por arrastre de vapor de agua se recolectó en 50 mL de ácido bórico (H_3BO_3) 4,0% P/V conteniendo gotas de indicador combinado (rojo de metilo 0,016% P/V y verde de bromocresol 0,083% P/V en etanol). La valoración se realizó con solución estandarizada de H_2SO_4 0,1 N hasta viraje del indicador. Paralelamente se realizó un ensayo blanco en ausencia de la muestra.

El porcentaje de proteína bruta se calculó por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Proteína bruta (\% } P/P) = \frac{[(V_m - V_b)] \cdot N_a \cdot 0,14007}{M} \cdot 100 \cdot f_{N \rightarrow P} \quad (30)$$

V_m y V_b son los volúmenes, en mL, de solución estandarizada de H_2SO_4 gastada en la valoración de la muestra y del blanco, respectivamente; N_a es la normalidad de la solución de H_2SO_4 ; 0,014007 es la masa de un miliequivalente de nitrógeno, en gramos; M es la masa de muestra, en gramos; $f_{N \rightarrow P}$ es el factor de conversión de nitrógeno a proteína (6,25).

Además, para verificar la recuperación completa del nitrógeno, se realizaron ensayos con un compuesto patrón de contenido conocido de nitrógeno. Para este fin se empleó urea, la cual se secó previamente a 100 °C durante 3 horas antes del análisis. La recuperación de nitrógeno se evaluó a través del factor de recuperación, f_R :

$$f_R = \frac{N_E}{N_T} \quad (31)$$

N_E y N_T son los porcentajes experimentales y teóricos (% P/P) de nitrógeno, respectivamente. Para la urea, $N_T = 46,67\%$ P/P y N_E se calculó como:

$$N_E (\% \text{ P/P}) = \frac{[(V_p - V_b)] \cdot N_a \cdot 0,14007}{M_p} \cdot 100 \quad (32)$$

V_p es el volumen gastado, en mL, de solución estandarizada de H_2SO_4 en la valoración del patrón y M_p es la masa de patrón, en gramos. Los demás parámetros se definieron en la ecuación 30.

1.1.7.2. Método de micro-Kjeldahl con colorimetría final

En el presente trabajo, el método de micro-Kjeldahl con colorimetría final se utilizó como método alternativo para la determinación del contenido de nitrógeno total y proteína bruta de los concentrados. El método está basado en la reacción de Berthelot bajo condiciones de alcalinidad neta. El NH_4^+ formado en la etapa de digestión se transforma en NH_3 en las condiciones del ensayo y se determina espectrofotométricamente utilizando una reacción altamente sensible con salicilato de sodio, nitroprusiato de sodio e hipoclorito de sodio. Los compuestos generados en la reacción

(indofenolatos) absorben fuertemente radiación en la región visible del espectro electromagnético. En el método de micro-Kjeldahl con colorimetría final, el contenido de nitrógeno puede determinarse con exactitud empleando una cantidad mínima de muestra en la etapa de digestión. Los resultados obtenidos por el método colorimétrico evidencian una excelente correlación con los obtenidos por el método tradicional de destilación-titulación (Nkonge y Ballance, 1982).

En la etapa de digestión se empleó entre 10 y 20 mg de muestra liofilizada y finamente molida, la cual se colocó en un balón Kjeldahl de 100 mL junto con 0,11 g de la mezcla catalizadora (K_2SO_4 , TiO_2 y $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, en proporción másica 100:3:5, respectivamente) y 3,0 mL de H_2SO_4 concentrado (98% P/p , $\delta = 1,84$ g/mL). Luego de la digestión completa de la muestra, el digestato se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, se agregó cuidadosamente agua destilada y el contenido del balón se transfirió cuantitativamente a un matraz aforado de 100 mL, llevando a volumen final con agua destilada.

Además, como reactivo patrón se utilizó $(NH_4)_2SO_4$. Se preparó una solución madre de concentración de nitrógeno ([N]) 100 $\mu\text{g/mL}$, colocando 48,2 mg de la sal (previamente secada a 103 °C durante 3 h) en un balón de 100 mL. La digestión se realizó empleando la misma cantidad de mezcla catalizadora y H_2SO_4 concentrado que en las muestras. Como blanco se utilizó sólo la mezcla catalizadora y el ácido. Luego, la solución del blanco se utilizó para realizar distintas diluciones de la solución madre del patrón de $(NH_4)_2SO_4$.

Para la determinación del contenido de nitrógeno se prepararon los siguientes reactivos: reactivo A, preparado por disolución de Na_2HPO_4 (0,2 M), NaOH (0,2 M) y tartrato de sodio y potasio tetrahidratado (Sal de Rochelle, 0,36 M) en agua destilada; reactivo B: NaOH 2,5 M; reactivo C: solución de salicilato-nitroprusiato, preparada por disolución de salicilato de sodio (20,0 g) y nitroprusiato de sodio (30 mg) en agua destilada hasta completar un volumen final de 100 mL; reactivo D: solución de hipoclorito de sodio (> 5 g cloro activo/L), preparada por dilución 1/10 V/V de agua lavandina concentrada comercial (55–60 g cloro activo/L).

Para la reacción colorimétrica se mezcló 0,5 mL del digestato (muestra, patrón o blanco) con 1,5 mL de buffer de trabajo (mezcla 1:1 V/V de reactivos A y B). Luego se agregó 0,4 mL de reactivo C, se agitó con un agitador de vórtice (vórtex) y se incubó en baño termostático a 25 °C durante 10 min. Finalmente, se agregó 0,2 mL de reactivo D, se agitó y se incubó a la misma temperatura durante 30 min. La mezcla resultante se diluyó con 10 mL de agua destilada y se midió la

absorbancia a 660 nm (Abs_{660}) empleando un espectrofotómetro UV-visible T60 (PG Instruments; Leicestershire, Reino Unido).

El proceso de calibrado se realizó con distintas diluciones de la solución madre patrón de $(NH_4)_2SO_4$. El rango seleccionado de $[N]$ (2-25 $\mu g/mL$) aseguró una respuesta lineal de la Abs_{660} corregida por el blanco (Abs_{660c}) con $[N]$, de acuerdo con el trabajo original (Nkonge y Ballance, 1982). La ecuación de la recta de mejor ajuste a los datos experimentales ($Abs_{660c} = B \cdot [N] + A$) se obtuvo por análisis de regresión lineal mediante el método de los mínimos cuadrados usando el software Origin 8,0 (OriginLab Corporation; Northampton, Massachussets, EE. UU.). Un ejemplo típico se muestra en la Figura 24.

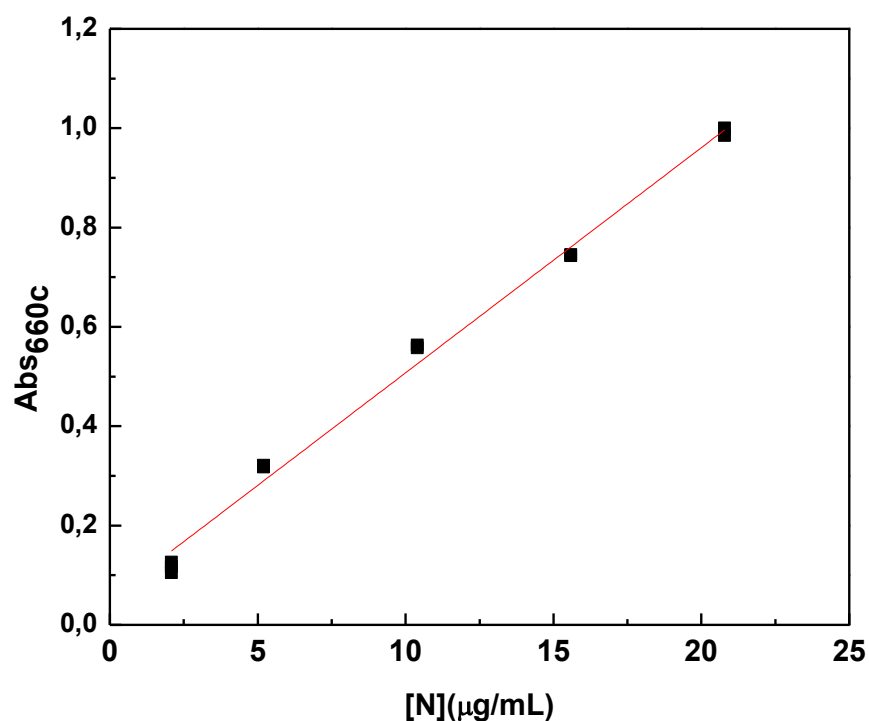


Figura 24: Recta de calibración para el método de micro-Kjeldahl realizada con soluciones estándar de sulfato de amonio en un rango variable de $[N]$ de 2-25 $\mu g/mL$. La ecuación de la recta es: $Abs_{660c} = 0,04532 \cdot [N] - 0,05541$ ($r^2 = 0,99$).

La $[N]$ en los digestatos provenientes de las muestras se obtuvo a partir de los valores de Abs_{660c} usando la recta de calibración:

$$[N] (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Abs}_{660\text{c}} - A}{B} \quad (33)$$

A y B son las ordenadas al origen y la pendiente de la recta de calibración, respectivamente.

Finalmente, el porcentaje de proteína bruta se calculó como:

$$\text{Proteína bruta (\% P/P)} = \frac{[N] \cdot V_D \cdot f_C}{M} \cdot 100 \cdot f_{N \rightarrow P} \quad (34)$$

[N] es la concentración de nitrógeno en el digestato ($\mu\text{g/mL}$), V_D es el volumen del digestato (100 mL), f_C es el factor de conversión de μg a g ($1 \cdot 10^{-6}$), M es la masa de muestra en gramos y $f_{N \rightarrow P}$ es el factor de conversión de nitrógeno a proteína (6,25).

1.1.8. Determinación del contenido de carbohidratos totales

El contenido de carbohidratos en el ST, en los concentrados y en las dispersiones acuosas (sección 1.16) se cuantificó por el método de fenol-ácido sulfúrico (método 988.12, AOAC, 1997), el cual determina conjuntamente el contenido de azúcares simples y polisacáridos. Los furfurales generados por deshidratación de los monosacáridos en ácido sulfúrico concentrado reaccionan químicamente con el fenol y generan compuestos de adición, los cuales absorben fuertemente radiación en el rango visible del espectro electromagnético (Dubois *et al.*, 1951).

Como reactivo patrón se empleó glucosa de calidad HPLC. Se preparó una solución madre patrón de concentración de glucosa ([Glu]) 0,1% P/V (1000 $\mu\text{g/mL}$) en agua bidestilada y a partir de la misma, diluciones en un rango de [Glu] entre 10 y 70 $\mu\text{g/mL}$. Como blanco se utilizó agua bidestilada. Para el ST filtrado (sección 1.1) se tomó 1,0 mL y se realizó una dilución 1/200 V/V con agua bidestilada. En los concentrados se prepararon dispersiones acuosas (0,1 % P/V) en agua bidestilada por agitación magnética suave durante 2 h; seguidamente se realizó una dilución 1/20 V/V antes del análisis.

Para realizar la reacción colorimétrica, se agregó 1,0 mL de agua bidestilada (blanco) o 1,0 mL de las soluciones (patrones, muestras) y 0,5 mL de fenol 5,0% P/V en tubos de ensayo de vidrio (18 mm diámetro), incubando durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente se agregó 2,5 mL

de H₂SO₄ concentrado (98% ^p/_p, δ = 1,84 g/mL) y se agitó en un vórtex. La mezcla resultante se incubó durante 20 min a 37 °C en un baño termostático. Finalmente, se midió la absorbancia a 480 nm (Abs₄₈₀) en espectrofotómetro UV-visible T-60 (PG Instruments; Leicestershire, Reino Unido); a esta longitud de onda absorben los compuestos conjugados del fenol con furfurales provenientes de la deshidratación de las hexosas (Dubois *et al.*, 1951).

El proceso de calibrado se realizó con distintas diluciones de la solución madre patrón de glucosa. El rango seleccionado de [Glu] (10-70 µg/mL) aseguró una respuesta lineal de la Abs₄₈₀ corregida por el blanco (Abs_{480c}) con [Glu]. La ecuación de la recta de mejor ajuste a los datos experimentales (Abs_{480c} = B·[Glu] + A) se obtuvo por análisis de regresión lineal mediante el método de los mínimos cuadrados usando el software Origin 8.0 (OriginLab Corporation; Northampton, Massachussets, E.E.U.U). Un ejemplo típico se muestra en la Figura 25. La concentración de hidratos de carbono totales (HC) en las soluciones de la muestra y expresada como [Glu], se obtuvo a partir de los valores de Abs_{480c} usando la recta de calibración:

$$\text{HC: [Glu] } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Abs}_{480c} - A}{B} \quad (35)$$

A y B son las ordenadas al origen y la pendiente de la recta de calibración, respectivamente.

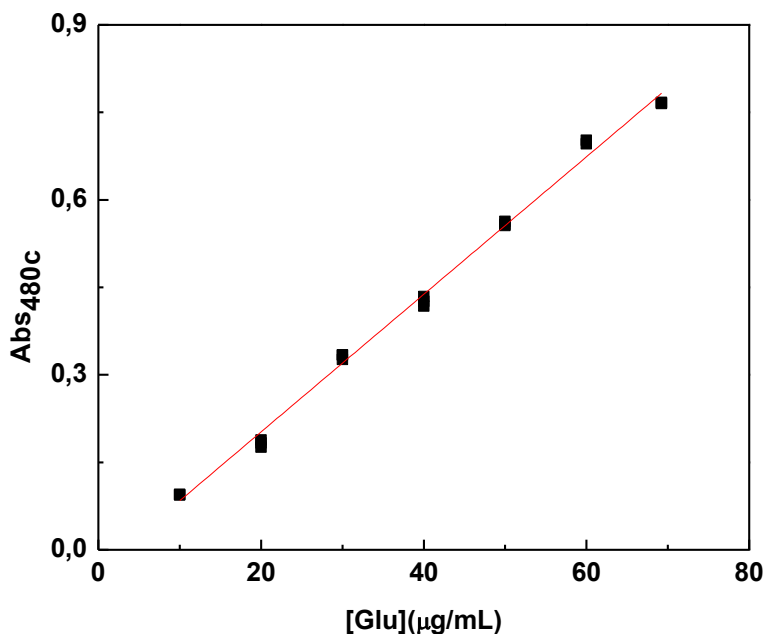


Figura 25: Recta de calibración para el método fenol-ácido sulfúrico realizada con soluciones estándar de glucosa en un rango variable de [Glu] de 10-70 µg/mL. La ecuación de la recta es: $Abs_{660c} = 0,0117 \cdot [Glu] - 0,033$ ($r^2 = 0,99$).

El porcentaje de hidratos de carbono totales en los concentrados se calculó como:

$$HC: [Glu] (\% P/p) = \frac{[Glu] \cdot V_D \cdot f_d \cdot f_c}{M} \cdot 100 \quad (36)$$

En las dispersiones acuosas, el porcentaje de hidratos de carbono para la determinación de solubilidad de hidratos de carbono (sección 1.16) se calculó como:

$$HC: [Glu] (\% P/V) = [Glu] \cdot f_d \cdot f_c \cdot 100 \quad (37)$$

[Glu] es la concentración de hidratos de carbono totales expresados como glucosa (µg/mL), V_D es el volumen de la dispersión de concentrado, f_d es el factor de dilución de la dispersión, f_c es el factor de conversión de µg a g ($1 \cdot 10^{-6}$) y M es la masa de muestra en gramos.

1.1.9. Determinación de fibra dietaria total

La determinación de fibra dietaria total se solicitó como servicio técnico a la Cátedra de Nutrición y Bromatología (Facultad de Bioquímica y Farmacia, Universidad de Buenos Aires); se utilizó el método gravimétrico-enzimático oficial de la AOAC (985.29; AOAC, 1997). La muestra, previamente molida, tamizada, secada y desgrasada, se digirió enzimáticamente por duplicado en dispersión acuosa y en forma sucesiva con α -amilasa (95 °C), proteasa (60 °C) y amiloglucosidasa (60 °C). Los componentes que contribuyen a la fibra dietaria total se separaron del digestato por precipitación con etanol y luego se secaron a 103 °C a presión atmosférica normal. Para la obtención de la fibra dietaria total, una de las réplicas de los residuos secos se calcinó por vía seca (550 °C) y con la restante se determinó el contenido de proteína bruta por el método de Kjeldahl (N $\times$ 6,25). Estos ensayos finales se realizaron para corregir la masa de los residuos secos por minerales y proteína no digerida en la etapa de digestión (BeMiller, 2010). El contenido de fibra dietaria total de los concentrados se expresó como porcentaje en peso (P/P) sobre la muestra inicial.

1.1.10. Determinación del contenido de lisina total y reactiva**1.1.10.1. Lisina total**

La realización de este análisis se solicitó como servicio técnico al Laboratorio Dr. Rapela (Buenos Aires, Argentina); el contenido de lisina se determinó empleando el método oficial AOAC 994.12 (AOAC, 1997). En este método, la muestra se preparó para el análisis por tratamiento con ácido per fórmico para la oxidación de los aminoácidos azufrados, la inactivación del agente oxidante con metabisulfito de sodio, la hidrólisis ácida de las proteínas con HCl 6,0 M y la dilución y neutralización parcial del hidrolizado con buffer citrato de sodio hasta ajustar el pH 2,2. La determinación de aminoácidos individuales en el hidrolizado se realizó por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en una columna de intercambio iónico con posterior derivatización con ninhidrina. El contenido de lisina total (LT) de los concentrados se expresó en % P/P sobre proteína total (equivalente a g/16 g N), teniendo en cuenta sus contenidos de proteína bruta (secciones 1.1.7.1 y 1.1.7.2).

1.1.10.2. Lisina reactiva

El contenido de lisina reactiva (LR) se determinó utilizando el método espectrofotométrico basado en la reacción de las aminas primarias con el o-ftalaldehído (OPA), la N-acetilcisteína (NAC) en medio alcalino (Medina Hernández y García Álvarez-Coque, 1992). En vasos de precipitado de 50 mL, se pesaron 20 mg de cada muestra y se adicionó buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,0 con dodecil sulfato de sodio (SDS) 1,0% P/V , hasta alcanzar una masa final de 25 g. Los concentrados se dispersaron por agitación magnética durante 2 h y las dispersiones resultantes se trataron a 100 °C en un baño en ebullición durante 30 min para solubilizar completamente las proteínas. Luego se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 800×g durante 15 min a 20 °C (centrífuga Rolco CM 4080 Millenium; Buenos Aires, Argentina) (Ingrassia *et al.*, 2017). Los sedimentos se descartaron y los sobrenadantes se emplearon para la determinación de LR.

Como reactivo patrón se utilizó clorhidrato de L-lisina, previamente secado a 105 °C durante 3 h. Se preparó una solución madre 8,0 mM del aminoácido en buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,0 con SDS 1,0% P/V y se realizaron distintas diluciones con el mismo buffer para el proceso de calibrado (Ingrassia *et al.*, 2017).

Por otro lado, se preparó el reactivo de OPA-NAC mezclando 25 mL de una solución 0,025 M de OPA en etanol, 2,5 mL de una solución acuosa de NAC 0,025 M y 200 mL de una solución buffer tetraborato de sodio 100 mM, pH 9,5 en un matraz aforado de 1 L, llevado a un volumen final con agua destilada.

Para realizar la determinación espectrofotométrica se añadieron 10 mL del reactivo OPA-NAC a la solución de 25 mL del sobrenadante de la preparación de las muestras o de las soluciones estándar de clorhidrato de L-lisina. La absorbancia se midió a 335 nm empleando el espectrofotómetro UV-visible T-60 (PG Instruments; Leicestershire, Reino Unido).

El proceso de calibrado se realizó con distintas diluciones de la solución madre patrón de L-lisina. El rango seleccionado de la cantidad de mili moles de lisina (Lis) (0,0008–0,0032) aseguró una respuesta lineal de la Abs_{335} corregida por el blanco (Abs_{335c}) con Lis, de acuerdo con el método original (Medina Hernández y García Álvarez-Coque, 1992). La ecuación de la recta de mejor ajuste a los datos experimentales ($Abs_{335c} = B \cdot Lis + A$) se obtuvo por análisis de regresión lineal mediante el método de los mínimos cuadrados usando el software Origin 8.0 (OriginLab Corporation; Northampton, Massachusetts, E.E.U.U.). Un ejemplo típico se muestra en la Figura 26.

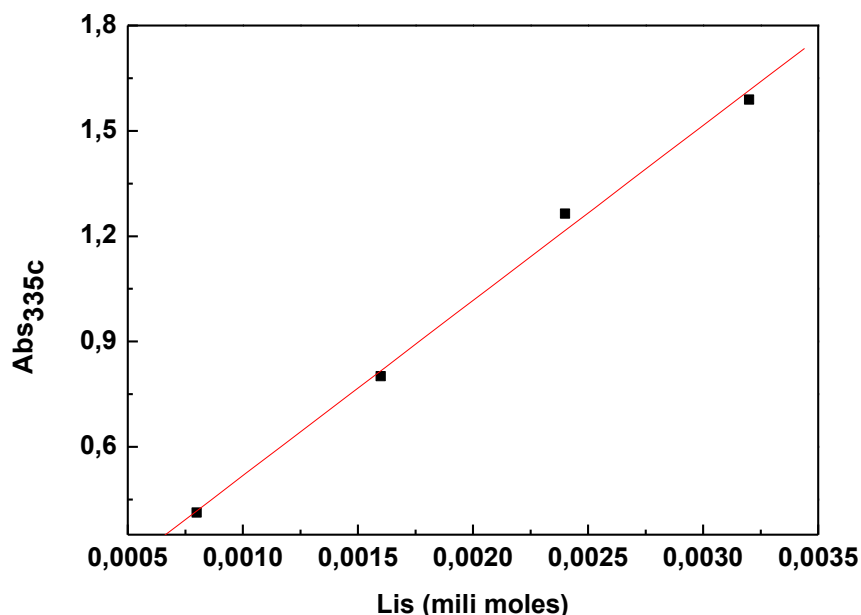


Figura 26: Recta de calibración para la determinación de lisina reactiva, obtenida a partir del procesamiento de soluciones estándar de clorhidrato de L-lisina en un rango de cantidad de mili moles 0,0008–0,0032. La ecuación de la recta es: $Abs_{335c} = 535,37 \cdot Lis - 0,027$ ($r^2 = 0,99$).

En los concentrados, sólo los restos aminoacídicos de lisina reactivos con el OPA y el NAC son los que generan los compuestos que absorben a 335 nm, de manera que la cantidad de mili moles de LR se obtuvo a partir de los valores de Abs_{335c} usando la recta de calibración:

$$LR \text{ (mili moles)} = \frac{Abs_{335c} - A}{B} \quad (38)$$

A y B son las ordenadas al origen y la pendiente de la recta de calibración, respectivamente.

Finalmente, el contenido de LR expresado en % P/P sobre proteína total (equivalente a g/16 g N), se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$LR \text{ (\% P/P)} = \left(\frac{LR \text{ (mili moles)} \cdot 0,141615}{M \cdot P} \right) \cdot 100 \quad (39)$$

0,141615 es la masa de un mili-mol de lisina en gramos, M es la masa de muestra, en gramos y P es el porcentaje de proteína bruta (% P/P, $N \times 6,25$; ecuaciones 30 y 32).

1.1.10.3. Lisina no reactiva

A partir del contenido de lisina total (LT) y de lisina reactiva (LR), determinada de acuerdo con los procedimientos descritos en las secciones 1.1.10.1 y 1.1.10.2, se calculó el contenido de lisina no reactiva (LNR, % P/P sobre lisina total) como:

$$\text{LNR (\% P/P)} = \left[\frac{(\text{LT} - \text{LR})}{\text{LT}} \right] \cdot 100 \quad (40)$$

1.1.11. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con tricina (TSDS-PAGE)

La composición polipeptídica de los concentrados se evaluó por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y en presencia de tricina (TSDS-PAGE), la cual se utiliza comúnmente para separar proteínas en el rango de pesos moleculares 1–100 kDa. Además, es el método de preferencia para la aplicación en muestras donde la mayor parte de las proteínas tienen un peso molecular menor a 30 kDa (Schägger, 2006).

Los geles se obtuvieron en condiciones no reductoras y reductoras, empleando un equipo Bio-Rad Miniprotean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories Inc., EE. UU). Las proteínas son puestas en contacto con un agente tensoactivo como el SDS, el cual promueve la desnaturalización y formación de complejos de carga neta negativa con las proteínas. Debido a que los complejos SDS/proteína exhiben una relación similar carga/masa, el proceso de separación en el gel está determinado por la diferencia en el peso molecular de los polipéptidos. En este trabajo se siguió el procedimiento experimental descrito en el trabajo original de Schägger y Von Gadow (1987).

1.1.11.1. Reactivos

Los reactivos de grado electroforesis fueron: acrilamida, *N*, *N*'-metilenbisacrilamida, Tris(hidroximetil) aminometano (Tris), *N*-[Tris (hidroximetil)metil] glicina (tricina), urea, persulfato de amonio (APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$), *N*, *N*, *N*', *N*'- tetrametiletildiamina (TEMED), glicerol, dodecil sulfato de sodio (SDS, 99% de pureza), β -mercaptoetanol (β -ME) y Coomassie Brilliant Blue R-250. Las proteínas incluidas en los marcadores de peso molecular fueron: fosforilasa b (92,0 kDa), BSA (66,0 kDa), ovoalbúmina (45,0 kDa), anhidrasa carbónica (29,0 kDa), KTI (20,1 kDa) y α -lactoalbúmina (14,4 kDa).

Se prepararon las siguientes soluciones:

- a) Buffer de muestra 4 $\times$, pH 7,0: Tris-HCl 150 mM, glicerol, 30% P/V , SDS, 12,0% P/V y colorante Coomassie Brilliant Blue R-250, 0,05% P/V . Para obtener condiciones reductoras se agregó 2-mercaptoetanol (β -ME) a una concentración 6,0% V/V .
- b) Buffer de electrodo anódico 10 $\times$, pH 8,9: Tris 1,0 M, HCl 0,225 M.
- c) Buffer de electrodo catódico 10 $\times$, pH 8,25: Tris 1,0 M, Tricina 1,0 M, SDS 1,0% P/V .
- d) Buffer de gel 3 $\times$, pH 8,45: Tris 1,0 M, HCl 1,0 M, SDS 0,3% P/V .
- e) Solución A: Solución de acrilamida-bisacrilamida, disolviendo 48 g de acrilamida y 1,5 g de *N*, *N*'-metilenbisacrilamida en agua destilada hasta completar un volumen final de 100 mL.
- f) Solución B: Solución de acrilamida-bisacrilamida, disolviendo 46,5 g de acrilamida y 3,0 g de *N*, *N*'-metilenbisacrilamida en agua destilada hasta completar un volumen final de 100 mL.
- g) Solución de APS 10% P/V . Se preparó disolviendo la sal en agua bidestilada y se utilizó inmediatamente después de su preparación.
- g) Solución colorante: Coomassie Brilliant Blue R-250 0,192% P/V en una mezcla de agua/metanol/ácido acético (proporción volumétrica 10:10:4).
- h) Solución decolorante: Mezcla de etanol/agua/ácido acético (proporción volumétrica 25:20:5).

1.1.11.2. Preparación de los geles

Se prepararon geles de 1,5 mm de espesor a una concentración de 16% P/V y 4% P/V acrilamida-bisacrilamida para los geles separados y apilador, respectivamente. El gel separador se preparó mezclando bajo agitación magnética 1,0 mL de la solución A, 3,0 mL de la solución B, 3,0 mL del buffer gel 3 $\times$, 3,24 g de urea y agregando agua bidestilada hasta un volumen final de 9,0

mL. Se adicionaron 30 μ L y 3,0 μ L de APS 10% P/V y TEMED, respectivamente. En la parte superior del gel se agregó cuidadosamente 1,0 mL de una solución etanol/agua 1:1 V/V para minimizar la difusión del oxígeno al gel durante la polimerización, la cual se realizó a 37 °C durante 30 min.

Para elaborar el gel apilador se adicionaron 330 μ L de la solución A, 1,0 mL del buffer gel 3 $\times$ y se agregó agua bidestilada hasta completar un volumen final de 4,0 mL; posteriormente se agregó 30 μ L de APS, 3,0 μ L de TEMED y se incubó a 37°C durante 30 min a 37°C para la polimerización.

1.1.11.3. Preparación de las muestras

En primer lugar, se pesó una cantidad de concentrado para garantizar la siembra de 30 μ g de proteína por calle, de acuerdo con el contenido de proteína bruta (secciones 1.7.1 y 1.7.2). Los concentrados se disolvieron en 1 mL de buffer de muestra en presencia y ausencia de β -ME, se agitaron en un vortex y se trataron térmicamente en un baño de agua a 100 °C durante 5 min. Luego, se enfriaron en un baño de agua hasta alcanzar la temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 10.000 $\times$ g durante 10 min a 20 °C empleando una centrífuga Hermle modelo 129-Z200 (Wehningen, Alemania). Las proteínas usadas como patrones de peso molecular (sección 1.11.1) se utilizaron en forma directa, sin preparación previa, de acuerdo con las indicaciones dadas por el proveedor.

1.1.11.4. Condiciones de corrida, coloración, revelado y análisis de los geles

Se sembraron 10 μ L de muestras (30 μ g proteína) y el patrón de peso molecular y las corridas electroforéticas se realizaron a un voltaje constante de 120 V con una intensidad de corriente de 30 mA por placa. Los geles se tiñeron con la solución colorante durante 2 h y se decoloraron con la solución decolorante, con recambios constantes de la misma hasta completar una eficiente decoloración. Las imágenes de los geles se obtuvieron mediante un escáner HP Scanjet 3200c (Hewlett-Packard; Palo Alto, EE. UU.) y se procesaron empleando el software Adobe Photoshop Ligthroom CC2019 (Adobe Inc.; San Jose, CA, EE. UU.).

1.1.12. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR)

Para obtener los espectros FTIR, las muestras se dispersaron previamente en agua destilada (0,1% P/P) por agitación magnética durante 2 h. Luego, se colocó 0,1 mL de dispersión en el dispositivo de reflectancia total atenuada (ATR) hasta cubrir completamente el cristal de seleniuro de zinc (ZnSe); finalmente las dispersiones se secaron suavemente con aire tibio hasta alcanzar la deshidratación completa. Los espectros de FTIR se obtuvieron en el rango de $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ utilizando un espectrómetro Shimadzu modelo IR Affinity-1 (Shimadzu Scientific Instruments; Maryland, EE. UU.). Las condiciones de medición fueron: apodización Happ-Genzel; 45 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} . Las deconvoluciones y el procesamiento de los espectros FTIR se realizaron con el software IR Solution (Shimadzu Scientific Instruments; Maryland, EE. UU.) asociado al espectrómetro.

1.1.13. Análisis termogravimétrico (TGA)

Los ensayos de TGA se realizaron utilizando una termobalanza modulada TGA-Q500 (TA Instruments, LLC Waters; New Castle, EE. UU.). Se pesó 5–10 mg de muestra y se calentó a $10 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bajo una atmósfera de nitrógeno (caudal = $40 \text{ mL}/\text{min}$) y en un rango de temperatura $20\text{--}700 \text{ }^{\circ}\text{C}$. El equipo registró la variación porcentual de la pérdida de masa en función de la temperatura. En las curvas obtenidas se definieron tres zonas de degradación térmica en función de las temperaturas de inicio y final de los picos: zona I ($150 - 260 \text{ }^{\circ}\text{C}$), zona II ($260 - 360 \text{ }^{\circ}\text{C}$) y zona III ($360 - 430 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Para cada zona, se determinaron la temperatura de pico (T_p) y la pérdida parcial de masa (Δm , %).

1.1.14. Dependencia de la turbidez de las dispersiones con el pH

Se prepararon dispersiones acuosas (0,1% P/P) mediante agitación magnética suave durante 3 h en agua destilada, en urea 6,0 M y en solución de urea 6,0 M con ditiotreitól (DTT) 30 mM (Zhu *et al.*, 2017). Para obtener las curvas de turbidez en función del pH se agregaron alícuotas sucesivas de HCl 0,1 M a las dispersiones (20 mL) bajo agitación magnética suave y constante. Luego del

agregado de cada alícuota del ácido se registró el valor del pH e inmediatamente después se determinó la turbidez por medida de la absorbancia a 600 nm (espectrofotómetro UV-visible T60, PG Instruments; Leicestershire, Reino Unido).

1.1.15. Dependencia del potencial- ζ con el pH

Las muestras se dispersaron en agua bidestilada (0,1% P/p) por agitación magnética suave durante 2 h para asegurar una completa hidratación. Para cada muestra, el pH se ajustó a 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 o 7,0 usando soluciones de HCl 0,1 M o NaOH 0,1 M. Después del ajuste del pH, las dispersiones se filtraron usando un papel de filtro de celulosa Whatman N° 1. Las dispersiones filtradas se cargaron en celdas capilares (modelo DTS1070) provistas de electrodos de platino a cada lado (Figura 27) y el potencial- ζ se midió a 25 °C usando un analizador Malvern Zetasizer ZSP ZEN 5600 (Malvern Panalytical Ltd; Worcestershire, Reino Unido) a un ángulo fijo de 173°. Las determinaciones se realizaron en tres dispersiones preparadas en forma independiente y con 20 lecturas por réplica.

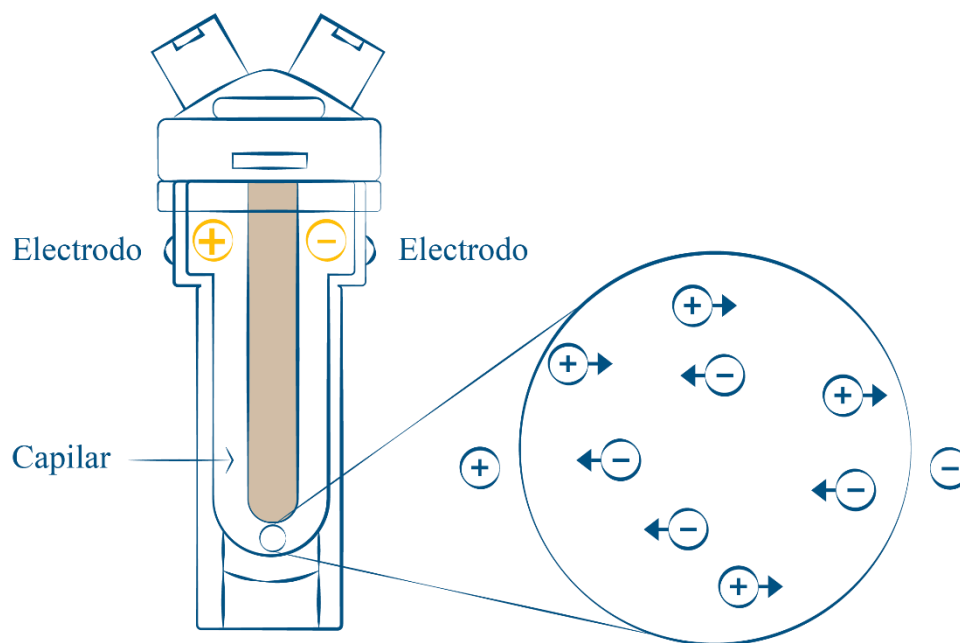


Figura 27: Representación de una celda capilar para la determinación de potencial- ζ

1.1.16. Dependencia de la solubilidad de proteínas e hidratos de carbono con el pH

Las muestras se dispersaron en agua destilada (0,1% P/V) por agitación magnética suave durante 2 h, se le ajustó el pH siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente (sección 1.1.15). Luego, las dispersiones se centrifugaron a $10.000\times g$ durante 20 minutos a 20 °C (centrífuga Hermle 129 Z200 M/H; Wehningen, Alemania) y se descartó el sedimento. El contenido de proteína e hidratos de carbono totales se determinaron tanto en los sobrenadantes como en las dispersiones acuosas iniciales, realizando diluciones adecuadas con agua destilada. El contenido de proteínas se determinó usando el método espectrofotométrico de Lowry modificado usando BSA como proteína estándar (Markwell *et al.*, 1978) y el de hidratos de carbono totales, por el método de fenol-sulfúrico siguiendo el procedimiento experimental descrito en la sección 1.1.8.

Para la determinación de la concentración de proteína en las dispersiones, se preparó una solución madre patrón de concentración de BSA 0,1% P/V (1000 $\mu g/mL$) en agua destilada y a partir de la misma, diluciones en un rango de concentración de proteína ([P]) entre 20 y 100 $\mu g/mL$. Como blanco se utilizó agua destilada.

Para la realización colorimétrica se prepararon los siguientes reactivos: reactivo A: se disolvieron 4,0 g de NaOH, 20,0 g de Na_2CO_3 , 10,0 g de SDS y 1,6 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado (Sal de Rochelle) en agua destilada hasta un volumen final de 1 L; reactivo B: se disolvieron 4,0 g de $CuSO_4\cdot 5H_2O$ en agua destilada hasta completar un volumen final de 100 mL; reactivo C: reactivo alcalino de cobre, obtenido mezclando los reactivos A y B en una proporción volumétrica 100:1 V/V ; reactivo D: reactivo comercial de Folin-Ciocalteu.

Para la reacción colorimétrica a 1,0 mL de agua destilada (blanco) o dispersión acuosa (muestra, patrón), se agregó 3,0 mL de reactivo C incubando durante 60 min a temperatura ambiente. Luego, se agregó 0,3 mL de reactivo D, se agitó vigorosamente en un vortex y se incubó 45 min. Finalmente, se midió la absorbancia a 660 nm (Abs_{660}) en un espectrofotómetro UV-visible T-60 (PG Instruments; Leicestershire, Reino Unido).

Como se mencionó anteriormente, el proceso de calibrado se realizó con distintas diluciones de la solución madre patrón de BSA. El rango seleccionado de [P] (20-100 $\mu g/mL$) aseguró una respuesta lineal de la Abs_{660} corregida por el blanco (Abs_{660c}) con [P], de acuerdo con el trabajo original (Markwell *et al.*, 1978). La ecuación de la recta de mejor ajuste a los datos experimentales ($Abs_{660c} = B\cdot[P] + A$) se obtuvo por análisis de regresión lineal mediante el método de los mínimos

cuadrados usando el software Origin 8.0 (OriginLab Corporation; Northampton, Massachussets, E.E.U.U). Un ejemplo típico se muestra en la Figura 28.

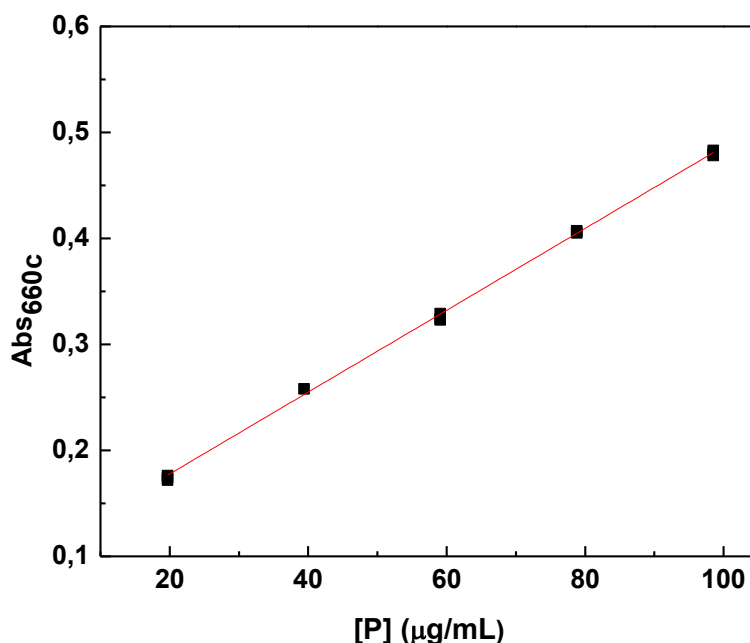


Figura 28: Recta de calibración para la determinación de proteína por el método de Markwell *et al* (1978), obtenida con disoluciones de BSA en un rango de concentración 20–100 µg/mL. La ecuación de la recta es: $Abs_{660c} = 0,00647 \cdot [P] - 0,0041$ ($r^2 = 0,99$).

La concentración de proteína en la dispersión se obtuvo a partir de Abs_{660c} , la pendiente (B) y la ordenada al origen (A) de la recta de calibración:

$$[P] (\mu\text{g/mL}) = \frac{Abs_{660c} - A}{B} \quad (41)$$

La concentración de proteínas en la dispersión inicial se calculó como:

$$[P] (\% \text{ P/V}) = [P] \cdot f_d \cdot f_c \cdot 100 \quad (42)$$

[P] es la concentración de proteínas (µg/mL), f_d es el factor de dilución de la dispersión y f_c es el factor de conversión de µg a g ($1 \cdot 10^{-6}$).

Finalmente, la solubilidad de proteínas (S_P) y de hidratos de carbono (S_{HC}) se calcularon como:

$$S_P = \left[\frac{P_s}{P_i} \right] \cdot 100 \quad (43)$$

$$S_{HC} = \left[\frac{HC_s}{HC_i} \right] \cdot 100 \quad (44)$$

donde P_s y HC_s son la concentración de proteínas e hidratos de carbono en los sobrenadantes (% P/V), respectivamente; P_i y HC_i son las concentraciones de proteínas e hidratos de carbono en las dispersiones iniciales (% P/V), respectivamente.

1.1.17. Propiedades superficiales de los concentrados en interfase agua/aire

1.1.17.1. Determinación de la tensión superficial

La tensión superficial en la interfase aire/agua, se midió en un tensiómetro automatizado Lauda TD3 LMT 850 asociado una unidad termostática Peltier para el control de la temperatura. La medición se realizó empleando un anillo Du Noüy previamente sumergido en una solución de etanol, lavado varias veces con agua destilada y por último, flameado a la llama de un mechero Bunsen para eliminar impurezas. Las dispersiones se prepararon a una concentración de 0,25% de proteína P/P y se ajustaron en un rango de pH de 2,0 a 7,0 con solución de HCl o NaOH 1,0 M. Antes de comenzar la medición automatizada, se ajustó la temperatura a 25 °C y la diferencia de densidad entre las dispersiones acuosas y el aire. Luego, se colocaron 20 mL de dispersión en un cristizador de vidrio provisto por el equipo y se sumergió el anillo Du Noüy en el seno de esta hasta colocarlo en una posición cercana a la interfase (Figura 27). Posteriormente, se midió la tensión superficial cada minuto y las medidas se optimizaron en el tiempo hasta llegar al valor de equilibrio ($\gamma_{s,D}$). El proceso se repitió con agua destilada ajustada al mismo pH que la dispersión ($\gamma_{s,A}$). La presión superficial de equilibrio (π_s) se calculó como:

$$\pi_s = \gamma_{s,A} - \gamma_{s,D} \quad (45)$$

1.1.17.2. Evaluación de la reología superficial

Las propiedades reológicas en la interfase aire/agua se evaluaron en dispersiones acuosas (1,0% de proteína P/p) en el rango de pH de 2,0 a 7,0. Se empleó un reómetro oscilatorio AR-G2 (TA Instruments, Waters LLC; Newcastle, DE, EE. UU.), al cual se asoció un anillo Du Noüy de Pt/Ir. Para la medición, se colocaron 20 mL de dispersión acuosa en un cristizador de vidrio de 6,7 cm de diámetro, posicionando el anillo Du Noüy en la interfase (Figura 29)

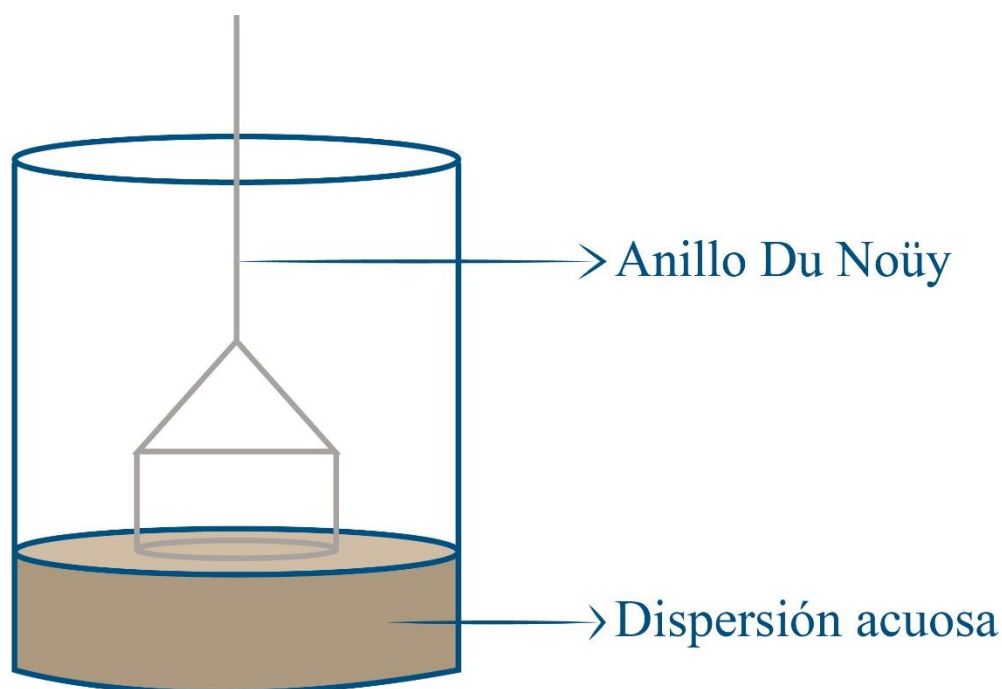


Figura 29. Representación esquemática de la geometría de anillo de Du Noüy en la interfase aire/agua para la determinación de la tensión superficial de equilibrio y de la reología interfacial.

Las mediciones reológicas oscilatorias y el registro de los módulos superficiales de almacenamiento y de pérdida (G' y G'') se realizaron a una temperatura de 25 °C controlada con un baño de agua (Jubalo ACW100, Jubalo Labortechnik; Seelbach, Alemania) asociado al reómetro. Las medidas se realizaron con una frecuencia constante de 0,3 Hz y una deformación ajustada al 3,0% dentro del rango de viscoelasticidad lineal. Para aumentar la reproducibilidad se fijó un *gap*

de 9000 μm para todas las muestras. La evolución general de las propiedades reológicas de la interfase se siguió mediante la variación de la viscosidad compleja superficial (η^*) frente al tiempo de acuerdo con el procedimiento descrito por Baldursdottir *et al.* (2010). η^* se calculó como:

$$\eta^* = \frac{\sqrt{(G')^2 + (G'')^2}}{\omega} \quad (46)$$

G' es el módulo superficial de almacenamiento, G'' es el módulo superficial de pérdida y ω es la frecuencia angular.

1.1.18. Evaluación de las propiedades espumantes

Para evaluar las propiedades espumantes, se prepararon dispersiones acuosas de los concentrados (1,0% de proteína P/P). El pH se ajustó a distintos valores en el rango 2,0–7,0 usando soluciones de HCl o NaOH 1,0 M. Se colocaron 1,5 mL de dispersiones acuosas en tubos graduados de 10 mL y la formación de la espuma se llevó a cabo incorporando aire con una aguja a una velocidad de flujo de 40 mL/min. El volumen de aire incorporado (Overrun, %) se determinó midiendo el volumen de espuma (V_e en mL) generado durante 1 minuto de burbujeo y se calculó como:

$$\text{Overrun (\%)} = \left[\frac{(V_e - 1,5)}{1,5} \right] \cdot 100 \quad (47)$$

Después de detener el burbujeo la espuma comienza a disminuir su volumen como resultado del colapso. Se determinó el tiempo medio de colapso ($t_{1/2}$, s) como el tiempo necesario para que el volumen de la espuma alcance la mitad de su valor ($V_e/2$) después de detenido el burbujeo (Figura 30). El $t_{1/2}$ se usó como parámetro de estabilidad (Martínez *et al.*, 2009).

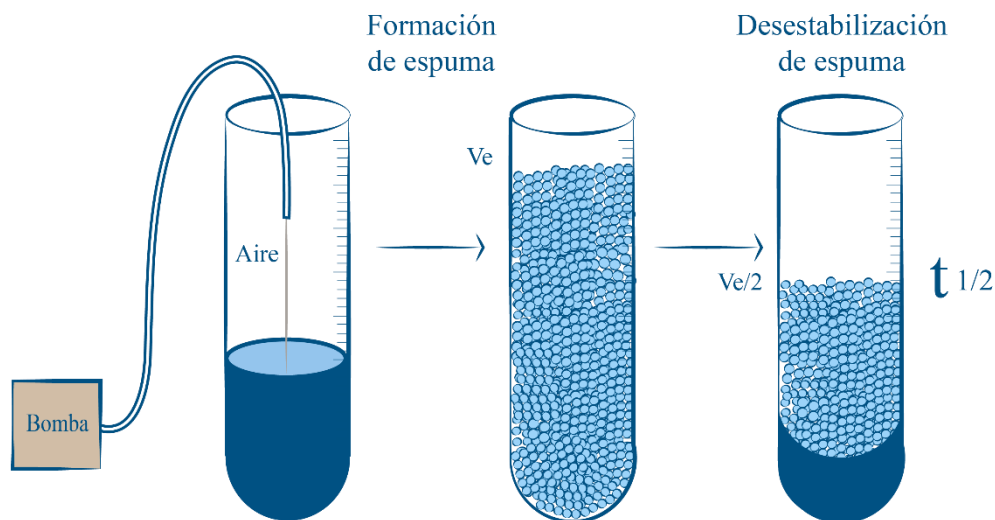


Figura 30. Representación esquemática del dispositivo utilizado para la evaluación de las propiedades espumantes de los concentrados.

1.1.19. Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado ($n = 3$) y los resultados se informaron como el promedio $\pm$ desvío estándar. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias entre las medias se evaluaron usando la prueba de Fisher (LSD) a un nivel de significancia del 5% ($p < 0.05$). El análisis estadístico se realizó con el software Statgraphics Centurion XV (Statpoint Technologies Inc.; Warrenton, VA, EE. UU.).

1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.2.1. Composición química del suero de tofu

En primer lugar, se analizó la composición química del ST de partida para la preparación de los concentrados. Como se mencionó anteriormente (sección 1.1), el pH y la densidad del ST fueron de $5,6 \pm 0,1$ y $1,057 \pm 0,003$ mg/mL, respectivamente. La filtración realizada previamente a la etapa de concentración permitió la obtención de un líquido de apariencia ópticamente opaca, pero sin la presencia de partículas coaguladas del tofu. La composición química del ST filtrado se observa en la Tabla 7. En un artículo reciente Chua y Liu (2019) recopilaron datos de composición de ST procedentes de distintos trabajos. El contenido de proteína bruta ($N \times 6,25$), hidratos de carbono totales y cenizas del ST obtenido en el presente trabajo estuvieron comprendidos en el rango de los valores informados previamente (Benedetti *et al.*, 2015; Chua *et al.*, 2018). En este contexto, el contenido de sólidos totales y de hidratos de carbono totales fue similar al informado por Sobral (2015) en una partida de ST procedente de la misma empresa elaboradora (sección 1.1); al mismo tiempo, el porcentaje de proteína cruda y de cenizas fue levemente inferior al reportado previamente por este autor.

Por otro lado, la leche de soja es un sistema disperso de composición compleja, debido a la presencia de proteínas solubles y agregadas, lípidos presentes en cuerpos oleosos (“oil bodies”), además de polisacáridos solubles, oligosacáridos, minerales y otros componentes minoritarios. Antes de la adición del agente precipitante para obtener el tofu, la dispersión acuosa de soja tiene un pH comprendido entre 6,0 y 7,0 y por ende, las proteínas de reserva y citosólicas tienen carga neta negativa (Peng *et al.*, 2016). La interacción del Ca^{2+} con los restos cargados negativamente de glutamato y aspartato altera el equilibrio de disociación ácido-base de estas especies, promoviendo un descenso en el pH que se tradujo en el valor observado para el ST ($5,6 \pm 0,1$). La interacción Ca^{2+} -proteína promovería la coagulación de las subunidades de las proteínas de reserva desnaturalizadas (glicinina y β -conglucina), formando el ión divalente parte de la estructura gelificada del tofu. No obstante, la interacción Ca^{2+} -proteína no tendría el mismo efecto de insolubilización sobre las proteínas citosólicas y el elevado contenido de calcio total (Tabla 7) indica que parte del mineral permanece principalmente asociado a estas proteínas en el ST. De hecho, de acuerdo con Ben Ounis *et al.* (2008), el ST contiene aproximadamente el 70% de los minerales agregados en la etapa de coagulación.

En base a lo mencionado, la variabilidad de la composición química del ST informada por distintos autores es esperable, debido no sólo a la utilización de variantes diferentes de poroto de soja como materia prima, sino también a diferencias en las condiciones industriales de procesamiento, como el empleo de agentes precipitantes (ácidos orgánicos y/o sales de calcio y magnesio), el tiempo y la temperatura de los tratamientos térmicos de cocción y las operaciones finales de prensado para la obtención del tofu.

Tabla 7: Composición química del suero de tofu (ST) filtrado

Sólidos totales (g/L)	Proteína bruta (N×6,25) (g/L)	Hidratos de carbono totales (g/L)	Cenizas (g/L)	Calcio total (g/L)
21,0 ± 0,2	3,2 ± 0,5	8,7 ± 0,4	4,4 ± 0,4	0,3 ± 0,1

Los parámetros de composición química se expresaron como el promedio de tres mediciones independientes ($n = 3$) ± desvío estándar.

1.2.2. Composición, propiedades estructurales, superficiales y espumantes de concentrados obtenidos a partir suero de tofu sin ajuste previo de pH.

En primer lugar se analizará la composición química, las propiedades estructurales, superficiales y espumantes de los concentrados obtenidos a partir del suero de tofu (ST) filtrado ($\text{pH } 5,6 \pm 0,1$), cuya composición química se mostró en la sección anterior.

1.2.2.1 Rendimiento de obtención y composición química

Los concentrados de suero de tofu obtenidos a partir del ST, exhibieron un rendimiento porcentual de obtención entre 0,4 a 0,5 % P/p . Los valores obtenidos son esperables considerando el bajo contenido de sólidos totales del material de partida (Tabla 7). Para CST50 el rendimiento fue levemente superior respecto a los obtenidos para CST65 y CST80.

La composición química de los concentrados de suero de tofu, obtenidos a partir del ST concentrado en diferentes condiciones de presión reducida y temperatura, se muestra en la Tabla 8. Los contenidos de proteína cruda, cenizas y calcio total, expresados en base seca,

evidenciaron un incremento con el aumento de la temperatura de obtención en el orden CST50 < CST65 < CST80 ($p < 0,05$) y el de lisina total (LT), en el orden CST50 < CST65 ~ CST80 ($p < 0,05$). La magnitud de los incrementos fue importante; para CST80, el porcentaje de proteína cruda, LT, cenizas y calcio total fue 27,1, 37,0, 25,2 y 41,3% mayor, respectivamente, al de CST50. Además, al incrementarse la temperatura de obtención, los concentrados también exhibieron un mayor contenido de lisina no reactiva (LNR) ($p < 0,05$).

En un trabajo previo, Sobral (2015) informó que el porcentaje de proteína del ST, luego de un tratamiento con una solución acuosa de ácido tricloroacético (TCA) 12% P/V , fue inferior al de proteína bruta, indicando que en el ST hay péptidos de bajo peso molecular. En este contexto, Yvon *et al* (1989) hallaron que todos los péptidos con menos de 7 residuos aminoacídicos (peso molecular promedio ~ 0,85 kDa) son solubles en TCA 12% P/V . En este trabajo, la etapa de diálisis se realizó utilizando membranas con un corte de 3,5 kDa (sección 1.2). El incremento en el porcentaje de proteína bruta y de LT de los concentrados con la temperatura de obtención sería atribuible a una mayor extensión de reacciones de glicosilación que involucran a los polisacáridos y los péptidos de peso molecular inferior a 3,5 kDa, favoreciendo la retención de estos durante la diálisis. Este argumento es consistente con el incremento del contenido de LNR con el aumento de la temperatura del tratamiento térmico, especialmente durante la obtención de CST80 (Henao Ossa *et al.*, 2020). Las reacciones de glicosilación se favorecen a mayor temperatura, en el rango de pH 3,0–10,0 y en un rango de actividad acuosa (a_w) comprendido entre 0,5 y 0,8 (Ingrassia *et al.*, 2017; Oliver *et al.*, 2006; Van Boekel, 2001). En este contexto, el proceso de glicosilación sería incipiente, ya que la reducción del volumen del ST en la etapa de concentración no fue suficiente para disminuir la a_w a valores dentro del rango óptimo.

Además, como se mencionó en la sección anterior, el ST tiene un elevado contenido de calcio total debido a la utilización de CaCl_2 como agente precipitante durante la obtención del tofu. Así, el incremento simultáneo en el contenido de proteína bruta, cenizas y calcio de los concentrados con el aumento de la temperatura de tratamiento térmico (50 a 80 °C) estaría directamente asociado a la fuerte interacción Ca^{2+} -proteína. De esta manera, durante la preparación de los concentrados, el ión divalente quedaría retenido en la etapa de diálisis.

Tabla 8: Composición química (% P/P , expresada en base seca) de los concentrados de suero de tofu obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu a presión reducida a 50 °C (CST50), 65 °C (CST65) y 80 °C (CST80). El porcentaje de humedad (P/P) de CST50, CST65 y CST80 fue $10,5 \pm 0,2$, $8,5 \pm 0,1$ y $9,3 \pm 0,3$, respectivamente.

Composición química	CST50	CST65	CST80
Proteína cruda (N×6.25)	$37,3 \pm 0,1^a$	$42,0 \pm 0,2^b$	$47,4 \pm 0,1^c$
Lisina total (LT)	$2,7 \pm 0,4^a$	$3,6 \pm 0,4^b$	$3,7 \pm 0,3^b$
Lisina no reactiva (LNR)	$14,8 \pm 0,3^a$	$17,1 \pm 0,2^b$	$29,7 \pm 0,4^c$
Hidratos de carbono totales	$43,5 \pm 0,4^a$	$42,9 \pm 0,5^a$	$42,1 \pm 0,6^a$
Fibra dietaria total	$31,8 \pm 0,7^a$	$32,6 \pm 0,6^{a,b}$	$33,0 \pm 0,5^b$
Cenizas	$13,1 \pm 0,2^a$	$13,7 \pm 0,2^b$	$16,4 \pm 0,2^c$
Calcio total	$4,6 \pm 0,1^a$	$5,0 \pm 0,1^b$	$6,5 \pm 0,1^c$

Los parámetros de composición se expresaron como el promedio de tres mediciones independientes ($n = 3$) $\pm$ desvío estándar. Los hidratos de carbono totales se expresaron como % glucosa P/P . LNR se expresó como % P/P sobre LT. Los valores promedio en una misma fila seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher.

Por otro lado, los concentrados no presentaron diferencias significativas en el contenido de hidratos de carbono totales ($p > 0,05$). Durante la etapa de diálisis, se eliminaron los oligosacáridos, sacarosa y monosacáridos presentes en el ST. Por ende, los carbohidratos presentes en los concentrados serían fundamentalmente polisacáridos no amiláceos, debido a que el grano de soja sólo contiene trazas de almidón (Karr-Lilienthal *et al.*, 2005). De hecho, todos los concentrados evidenciaron un elevado contenido de fibra dietaria total, que se incrementó muy levemente con el aumento de la temperatura de obtención ($p < 0,05$). La diferencia observada entre el contenido de hidratos de carbono totales y el de fibra dietaria se podría atribuir a las diferencias en el procedimiento experimental y los componentes que contribuyen a cada determinación: i) los hidratos de carbono totales se expresaron como % glucosa P/P , debido a que este monosacárido se utilizó como estándar en la calibración (sección 1.1.8). No obstante, los polisacáridos presentes en el ST están constituidos por distintos restos de monosacáridos y de ácidos urónicos (Karr-Lilienthal *et al.*, 2005). Además, los polisacáridos se hidrolizaron completamente en las condiciones del ensayo. En cambio, en la determinación de fibra dietaria total por el método gravimétrico-enzimático, los polisacáridos

no sufrieron hidrólisis en la digestión enzimática (sección 1.1.9); ii) Los restos glicosídicos de las proteínas son reactivos y contribuyen a la determinación de hidratos de carbono totales por el método del fenol-sulfúrico, en tanto que los mismos no contribuyen a la determinación de fibra dietaria total. Además, puede haber pequeños cambios en la respuesta del método de fenol-sulfúrico en función de la modificación química que sufren los hidratos de carbono debido a la glicosilación.

1.2.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con tricina (TSDS-PAGE)

En esta sección se analizaron los perfiles-electroforéticos de los concentrados proteicos de suero de tofu en condiciones desnaturalizantes por TSDS-PAGE en ausencia y presencia de β -ME (Figura 31). El método electroforético empleado tiene una resolución mejorada para proteínas de bajo peso molecular (Schägger y von Jagow, 1987). En condiciones reductoras (Figura 31a), todos los concentrados exhibieron patrones electroforéticos similares: se evidenció la presencia de las subunidades de α y α' de la β -conglucina (60–90 kDa), las bandas correspondientes a subunidad de la lectina (~35 kDa), el KTI (~20 kDa) y una banda de PM ~ 14 kDa, identificada como proteína de bajo peso molecular (BPM, Kao *et al.*, 2003). La presencia de subunidades de la β -conglucina en el ST fue observada previamente por Kao *et al.* (2003), quienes reportaron que la composición polipeptídica del ST está fuertemente influenciada por el tipo y concentración de sales de calcio utilizadas en la elaboración del tofu. Además, las bandas correspondientes a lectina, KTI y BPM también fue informada previamente por Espinoza-Martos *et al.* (2006) y Sobral (2015) en experimentos clásicos de SDS-PAGE.

En condiciones no reductoras, la composición polipeptídica de los tres concentrados fue similar con una atenuación de la intensidad de las bandas de BPM y de KTI, con respecto a las de los perfiles en condiciones no reductoras y la aparición concomitante de bandas tenues en el rango 21-29 kDa. El análisis comparativo de los perfiles electroforéticos en condiciones no reductoras reveló para CST80 una leve atenuación de la intensidad de las bandas correspondientes de las subunidades de α , α' y de lectina y la presencia de agregados proteicos en la parte superior del gel. Estos agregados estarían estabilizados principalmente por enlaces disulfuro, dado que desaparecieron en presencia de β -ME (Figuras 31 a y b).

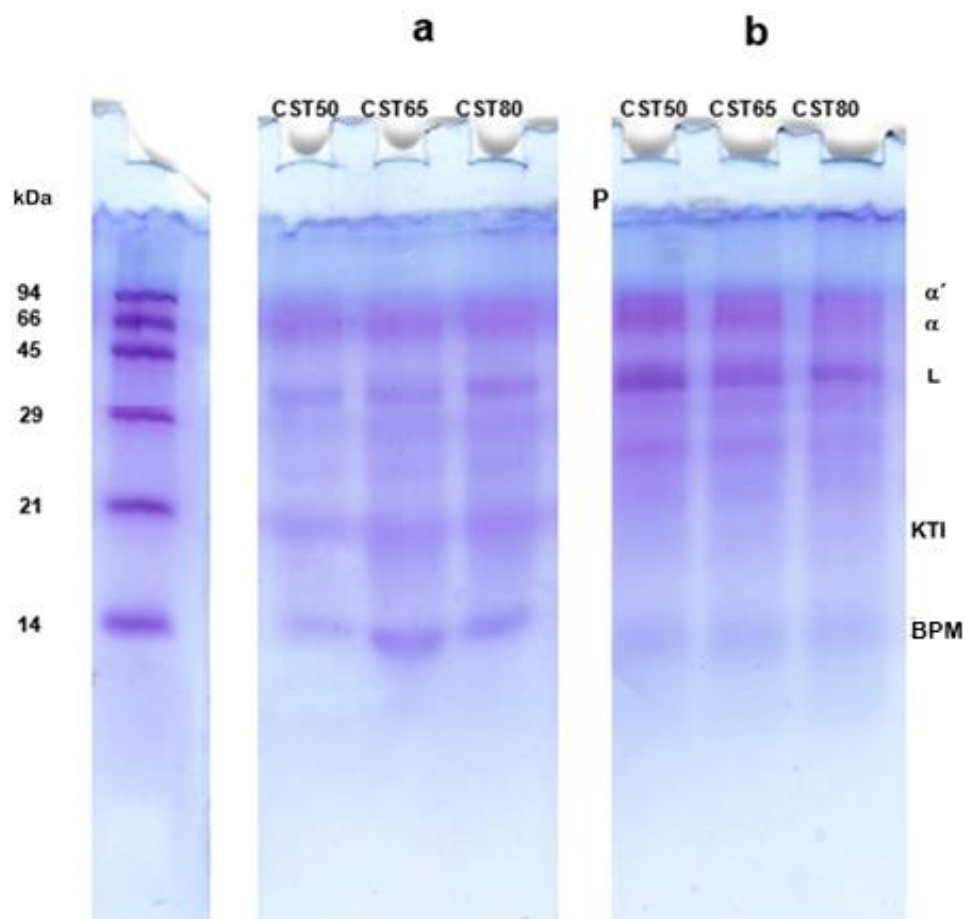


Figura 31: Perfiles TSDS-PAGE de los concentrados proteicos de suero de tofu obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu a presión reducida a 50°C (CST 50), 65°C (CST65°C) y 80°C (CST80): a) condiciones reductoras (en presencia de β -ME). b) condiciones no reductoras (en ausencia de β -ME). Marcadores de peso molecular (PM): α -lactoalbúmina, 14,4 kDa; inhibidor de tripsina, 20,1 kDa; anhidrasa carbónica, 30,0 kDa; ovoalbúmina, 43,0 kDa; albúmina sérica bovina, 67,0 kDa y fosforillos b, 94,0 kDa. La letra P indica la presencia de agregados proteicos en la parte superior del gel apilador.

1.2.2.3. Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja es un método que se basa en la interacción entre grupos funcionales de moléculas con la radiación infrarroja, resultando en transiciones vibracionales predecibles que dan una valiosa información sobre las características de las sustancias químicas presentes en una muestra. La caracterización estructural de los componentes puede realizarse a través de la posición y la intensidad de las bandas de absorción. Los rangos de longitudes de

onda útiles para el análisis cualitativo y cuantitativo de componentes presentes en los alimentos son el infrarrojo medio (MIR, 2,5–15,4 μm , equivalente al rango de número de onda 4000–650 cm^{-1}) e infrarrojo cercano (NIR, 0,8–2,5 μm , equivalente al rango de número de onda 12500–4000 cm^{-1}). La espectroscopía infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR) es la principal técnica dentro del MIR. Los dispositivos de reflectancia total atenuada (ATR), a diferencia de los de transmisión, requieren una mínima preparación de la muestra antes del análisis, eliminan la variabilidad de la intensidad de las bandas en función del camino óptico y permite la obtención de espectros en muestras sólidas y líquidos ópticamente opacos (Rodríguez-Saona *et al.*, 2017). Existen numerosos trabajos que demuestran la capacidad de la FTIR para detectar cambios estructurales en las proteínas en sistemas simples y de composición compleja (Singh, 2000) y se han reportado estudios estructurales de FTIR sobre proteínas de soja realizados en porotos enteros y subproductos como harinas, aislados proteicos y extrusados en mezclas con polisacáridos (Guerrero *et al.*, 2014; Ingrassia *et al.*, 2017; Sobral *et al.*, 2012). No obstante, son escasos los estudios estructurales por FTIR realizados sobre el tofu o suero de tofu.

En el presente trabajo, las diferencias estructurales de las proteínas en los concentrados obtenidos en distintas condiciones se evaluaron usando un dispositivo de ATR. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 32. Los espectros se analizaron en la región denominada *fingerprint* (1800 – 800 cm^{-1}), en la cual todos los concentrados proteicos exhibieron las bandas típicas de amidas de proteínas: amida I (1647 cm^{-1}), amida II (1545 cm^{-1}), amida II' (1390–1431 cm^{-1}) y amida III (1271–1311 cm^{-1}) (Nakamura *et al.*, 2006; Singh, 2000). Además, los espectros evidenciaron tres transiciones a 1044, 1073 y 1143 cm^{-1} en la zona de absorción de polisacáridos (Černá *et al.*, 2003).

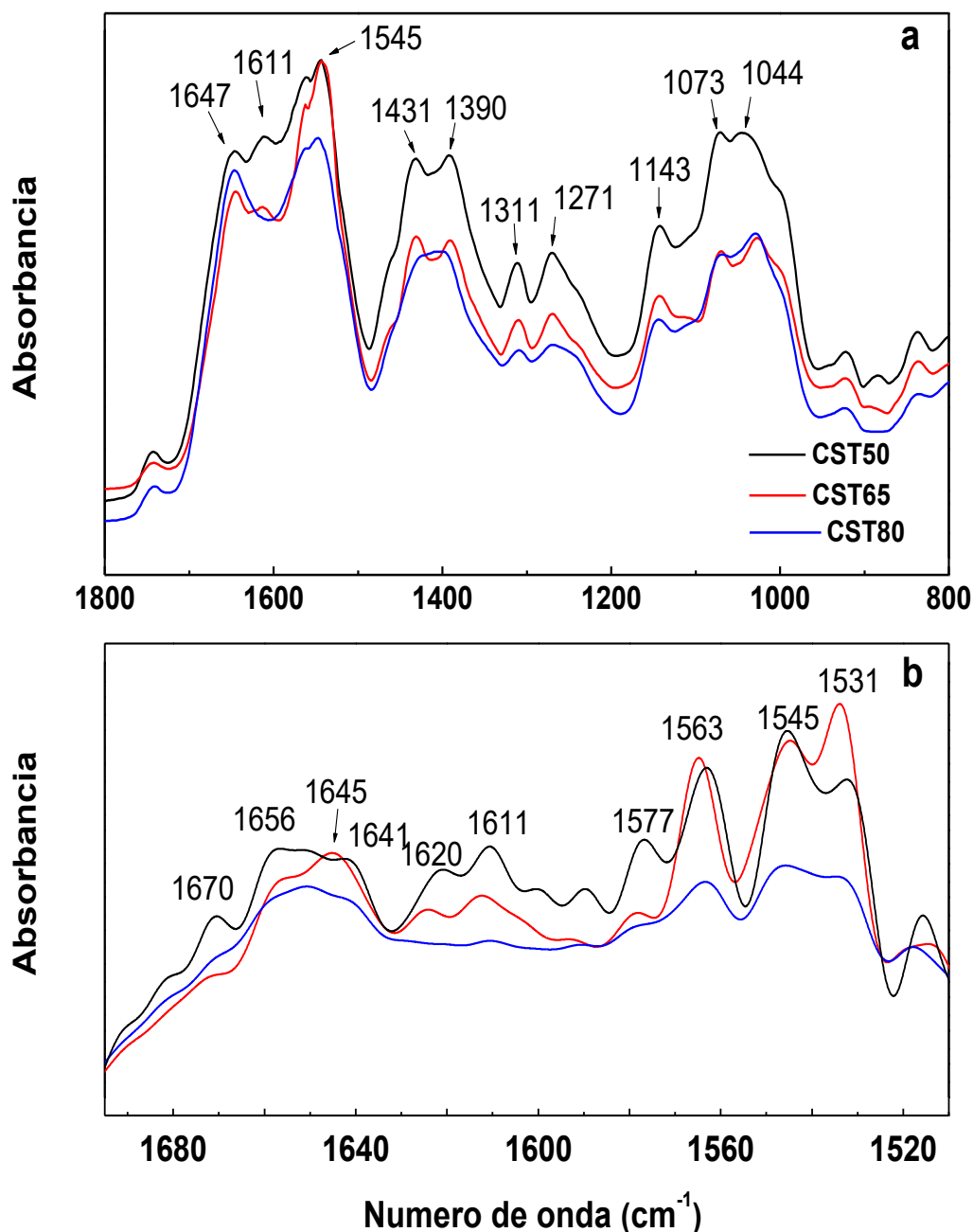


Figura 32: a) Espectros FTIR ($800\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$) y b) espectros FTIR (Zonas de amida I-II, $1520\text{--}1680\text{ cm}^{-1}$ luego de una deconvolución espectral) de los concentrados de suero de tofu obtenidos a por tratamiento térmico del suero de tofu a presión reducida a 50°C (CST50), 65°C (CST65) y 80°C (CST80). Los espectros obtenidos son el resultado de 45 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} .

En CST50, se observó un pico a 1611 cm^{-1} , que correspondería a la flexión del enlace NH del grupo amido de los residuos aminoácidos de glutamina (Kong y Yu, 2007). Esta banda de absorción se atenuó en CST65 y desapareció en CST80, acorde a una disminución en la movilidad de las cadenas laterales de aminoácidos en la cadena polipeptídica (Figura 32a).

Para corroborar esta observación, se evaluó la región correspondiente a las bandas de amida I y amida II (1680–1520 cm^{-1}) luego de una deconvolución espectral (Figura 32b). Las diferencias en intensidad de las bandas de amida I y II de los concentrados reflejarían la libertad o las restricciones de movimiento de los enlaces presentes en un grupo funcional, debido a las interacciones con otros grupos funcionales de la misma molécula o una contigua (Barth, 2007). En base a estudios previos de FTIR realizados sobre otras proteínas en la región espectral amida I y amida II, CST50 estaría constituida por las estructuras secundarias de α -hélice (1656 cm^{-1} , amida I; 1545 cm^{-1} , amida II), β -sheet (1620–1641 cm^{-1} , amida I; 1563 cm^{-1} , amida II) y, en menor medida, β -turn (1670 cm^{-1} , amida I) (Goormaghtigh *et al.*, 2006; Singh, 2000). Además, para CST65 se evidenció desplazamiento del pico de 1641 cm^{-1} a 1645 cm^{-1} y una desaparición de la banda a 1670 cm^{-1} (Figura 32b), resultados que indicarían un incremento en el desorden estructural en la cadena polipeptídica (Kong y Yu, 2007). Finalmente, para CST80 se observó una disminución de la intensidad en gran parte de las bandas de adsorción de la región amida I y amida II. El incremento de la temperatura durante la etapa de tratamiento térmico podría afectar la estructura secundaria de las proteínas presentes en el ST debido al aumento en la intensidad de las interacciones entre moléculas de proteína, promoviendo una mayor agregación proteica. En este contexto, la glicosilación y la agregación proteica también promovieron una marcada disminución en la intensidad de las bandas de absorción amida I y amida II en harinas desgrasadas de soja tratadas térmicamente (Ingrassia *et al.*, 2017).

1.2.2.4. Análisis termogravimétrico (TGA)

Como se mencionó en la sección anterior, los concentrados exhibieron importantes diferencias estructurales por FTIR en relación con la temperatura empleada en la etapa de concentración. Además, el concentrado obtenido a mayor temperatura (CST80) evidenció la presencia de agregados proteicos por TSDS-PAGE en los que están involucrados enlaces disulfuro. En este contexto, para evaluar indirectamente las diferencias estructurales de los principales componentes de los concentrados, en la presente sección se realizó un estudio complementario de degradación térmica por TGA. En el método de TGA, una termobalanza mide y registra en forma automatizada la pérdida de masa de una muestra en función del tiempo y la temperatura cuando la misma se somete a un programa de calentamiento (Park y Bell, 2004). En la Figura 33 se observan los perfiles diferenciales de degradación térmica de los concentrados. Además, los parámetros de degradación obtenidos a partir de los perfiles se

muestran en la Tabla 9. Dado que los concentrados están constituidos principalmente por proteínas y polisacáridos (Tabla 8), para el análisis de los resultados, los perfiles se dividieron en tres zonas (I, II y III) en el rango 150–450 °C. En este rango de temperatura, en atmósfera de nitrógeno, ocurren los procesos de degradación térmica de las proteínas y los polisacáridos (Kadam *et al.*, 2013; Seenivasan y Panda, 2017; Werner *et al.*, 2013).

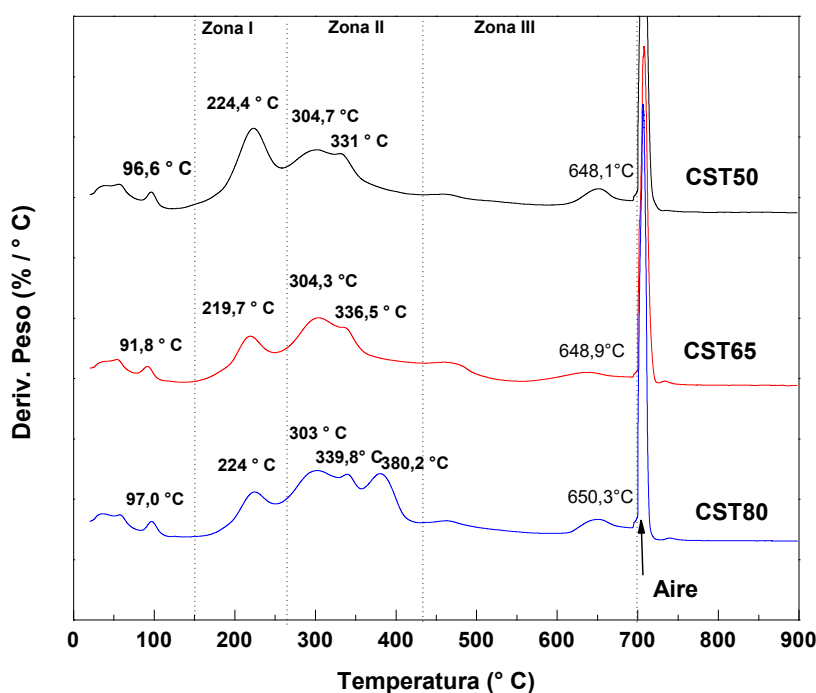


Figura 33: Perfiles diferenciales de degradación térmica de concentrados de suero de tofu obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu a presión reducida a 50 °C (CST50), 65 °C (CST65) y 80 °C (CST80). Condiciones de calentamiento 20–700 °C (atmósfera de nitrógeno); 700–900 °C (atmósfera de aire). Velocidad de calentamiento 10 °C·min⁻¹.

Los picos observados a temperaturas inferiores a 150 °C fueron consistentes con la pérdida de humedad de las muestras (Park y Bell, 2004). En la zona I, para todos los concentrados el pico observado en el rango 220–225 °C correspondería a la descomposición de proteínas (Kadam *et al.*, 2013). La pérdida de masa (Δm) fue significativamente mayor en el siguiente orden CST50 >> CST65 > CST80 ($p < 0,05$) (Tabla 9), que podría atribuirse a un aumento de la estabilidad térmica de las proteínas en los concentrados obtenidos a temperaturas más altas. En la zona II, correspondiente a la descomposición de polisacáridos (Werner *et al.*, 2013), la temperatura del primer pico (303–305 °C) fue similar en todos los concentrados; no obstante, el segundo pico mostró un Δm más alto en CST65 y CST80. En la

misma zona para CST80 se observó un pico adicional a 380°C ($\Delta m \sim 13\%$). En la zona III de los perfiles se observó un pico para todos los concentrados entre 648-651°C, el cual se puede atribuir a los productos de la descomposición térmica de proteínas y polisacáridos. Inmediatamente antes de la incorporación de aire, la pérdida parcial de masa de CST50, CST65 y CST80 fue de 64,2, 60,7 y 58,0% respectivamente, lográndose la oxidación completa en atmósfera de aire a 700 °C. Independientemente de la complejidad inherente a la composición de los concentrados (Tabla 8), el incremento de la estabilidad térmica de los concentrados estaría asociada a la naturaleza de los agregados formados durante la etapa de concentración. En este contexto, la menor susceptibilidad de CST80 a la degradación térmica se atribuiría a una mayor cantidad de agregados proteicos formados por puentes disulfuro (Figura 31) y un contenido significativamente mayor de calcio (Tabla 8). El ión divalente otorgaría una mayor estabilidad frente a la degradación térmica por la formación de complejos proteína-calcio. En un trabajo previo, han sido reportados resultados similares vinculados al impacto del calcio sobre la estabilidad térmica de aislados proteicos de soja (Scilingo y Añón, 1996).

Tabla 9: Parámetros de termodegradación obtenidos por análisis termo-gravimétrico (TGA) de concentrados de suero de tofu obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu a presión reducida a 50 °C (CST50), 65 °C (CST65) y 80 °C (CST80). En cada zona de termodegradación de la curva derivada del TGA (Figura 33), se obtuvieron las temperaturas de pico (Tp °C) y la pérdida parcial de masa (Δm , %).

Zona	Parámetros	Muestras		
		CST50	CST65	CST80
Zona I (150–260 °C)	Tp 1	223,4 $\pm$ 0,5 ^a	219,7 $\pm$ 0,4 ^b	224,7 $\pm$ 0,6 ^a
	$\Delta m1$	19,6 $\pm$ 0,5 ^a	12,1 $\pm$ 0,3 ^b	10,9 $\pm$ 0,5 ^c
Zona II (260–430 °C)	Tp 2	304,7 $\pm$ 0,5 ^a	304,3 $\pm$ 0,3 ^a	303,0 $\pm$ 0,6 ^b
	Tp 2'	331,0 $\pm$ 0,5 ^a	336,5 $\pm$ 0,4 ^b	339,8 $\pm$ 0,5 ^c
	Tp2''	Sin pico	Sin pico	380,2 $\pm$ 0,5
	$\Delta m2$	31,8 $\pm$ 0,4 ^a	30,6 $\pm$ 0,3 ^b	38,1 $\pm$ 0,5 ^c
Zona III (430–700 °C)	Tp 3	648,1 $\pm$ 0,2	648,9 $\pm$ 0,4	650,3 $\pm$ 0,5
	$\Delta m3$	1,7 $\pm$ 0,1 ^c	1,1 $\pm$ 0,2 ^b	0,8 $\pm$ 0,1 ^a

Los valores medios de una misma fila seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según lo determinado por la prueba de Fisher.

1.2.2.5. Dependencia de la turbidez y el potencial- ζ con el pH

En esta sección se investigaron los procesos de agregación de las proteínas y polisacáridos a través de la dependencia de la turbidez con el pH en agua destilada, en solución de urea 6,0 M y en solución de urea 6,0 M con agregado de ditioneitol (DTT, 30 mM), como agente reductor de enlaces disulfuro (Zhu *et al.*, 2017). Los resultados se muestran en la Figura 34. Al inicio del ensayo, las dispersiones de los tres concentrados en agua destilada mostraron valores de pH comprendidos entre 6,5 y 6,8 y a la vez, exhibieron una apariencia levemente turbia acorde con la presencia de agregados insolubles, que estarían conformados por proteínas y polisacáridos. Al disminuir el pH por adición de alícuotas sucesivas de solución de HCl, la turbidez se incrementó gradualmente, observándose valores máximos a pH 4,1, 4,5 y 4,4 para CST50, CST65 y CST80, respectivamente. Con la posterior adición de solución de HCl hasta el final del ensayo, se evidenció una lenta disminución de la turbidez; a pH 2,0, los concentrados mostraron valores de turbidez cercanos a 0,2, indicando que la disociación de los agregados insolubles no fue completa en medio fuertemente ácido (Figura 34a). El valor máximo de turbidez a un pH cercano a 4,0 se atribuiría a un debilitamiento de la repulsión electrostática entre las moléculas de los biopolímeros, favoreciendo los procesos de auto-asociación. Además, CST65 y CST80 evidenciaron mayor turbidez en casi todo el rango de pH, lo cual sería consistente con un mayor grado de agregación de las moléculas de los biopolímeros (Figura 34 a).

Además, la variación del potencial- ζ de los concentrados con el pH en las dispersiones acuosas se muestra en la Figura 35. CST50 mostró un valor de potencial- ζ cercano a cero a pH 4,0, en tanto que CST65 y CST80 evidenciaron potenciales- ζ a valores de pH ligeramente superiores a 4,0. Este resultado estaría de acuerdo con el máximo grado de agregación observado en las curvas de turbidez el rango de pH 4,0–4,5 (Figura 34a). Los valores absolutos de potencial- ζ de CST65 y CST80 fueron superiores a los de CST50 a valores de pH inferiores a 4,0, donde la carga neta de los concentrados es positiva. Por el contrario, a valores de pH superiores a 4,5, los valores absolutos de potencial- ζ de CST65 y CST80 fueron inferiores al de CST50. De acuerdo con Malhotra y Coupland (2004) y Carneiro-Da-Cunha *et al* (2011), la variación del potencial- ζ con el pH depende de la cantidad de grupos ionizables y el pKa en las moléculas de proteínas y polisacáridos.

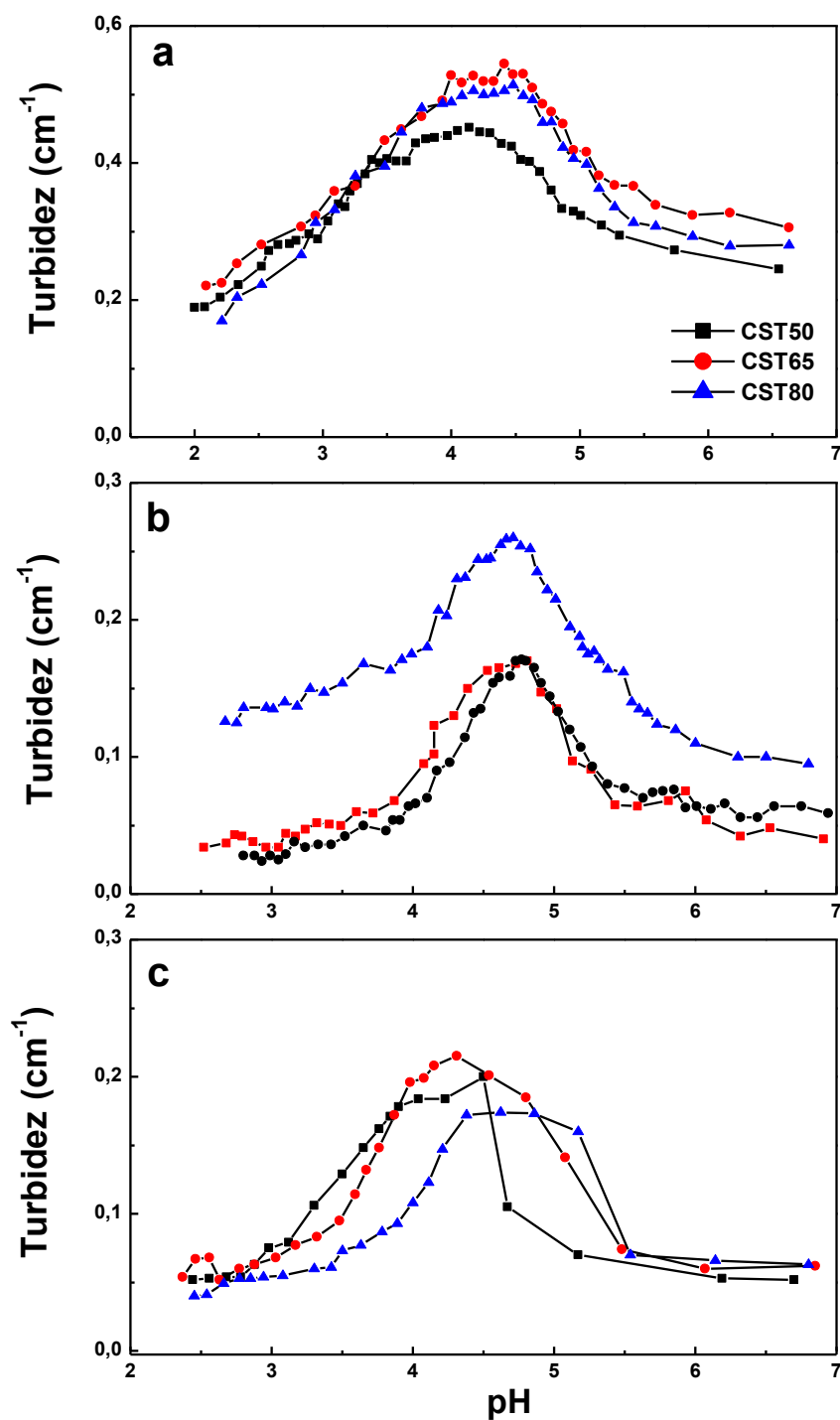


Figura 34: Efecto del pH sobre la turbidez de dispersiones acuosas (0,1 % P/P) de concentrados de suero de tofu obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu a presión reducida a 50 °C (CST50), 65 °C (CST65) y 80 °C (CST80): a) en agua destilada ;b) en solución de urea 6,0 M; c) en solución de urea 6,0 M + ditioneitol (DTT, 30 mM).

Como se mencionó anteriormente, el calcio tiene una alta tendencia a interactuar con los restos aminoácidos con carga negativa de glutamato y aspartato en las proteínas y de

ácidos urónicos en los polisacáridos. Por ende, la reducción de grupos funcionales con carga neta negativa sería mayor en CST65 y CST80, debido a que estos concentrados mostraron un contenido de calcio más elevado que el de CST50 (Tabla 8).

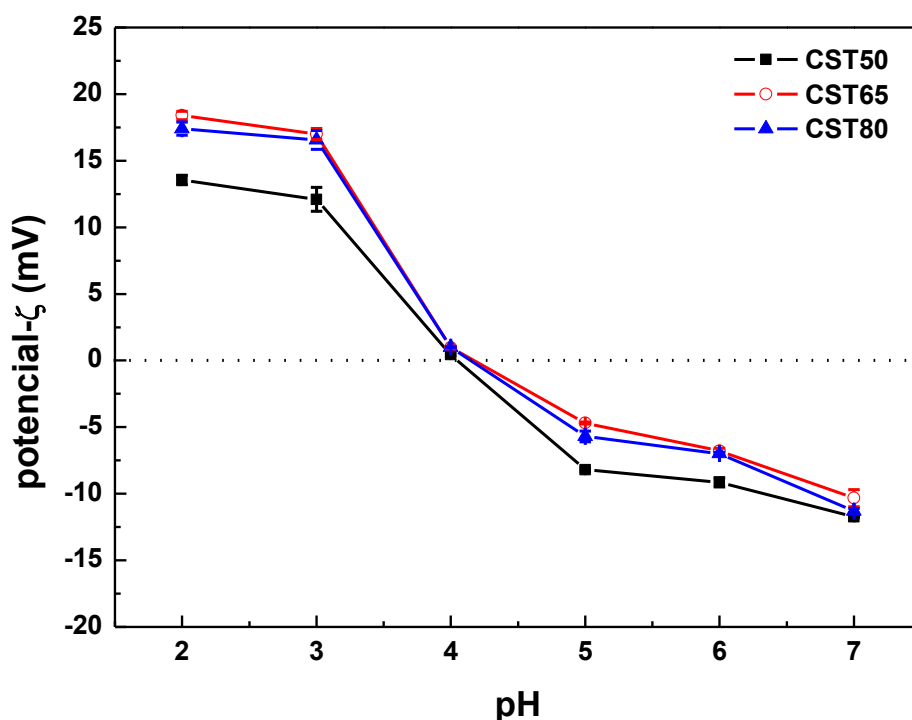


Figura 35: Efecto del pH sobre el potencial- ζ medido en dispersiones acuosas de concentrados de suero de tofu obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu a presión reducida a 50 °C (CST50), 65 °C (CST65) y 80 °C (CST80).

Por otra parte, la variación de la turbidez con el pH en las dispersiones acuosas de los concentrados se registró en presencia de urea 6,0 M (Zhu *et al.*, 2017). Se ha demostrado que la urea, como agente caotrópico, puede desestabilizar el núcleo hidrofóbico de las proteínas y disociar agregados proteicos, interfiriendo principalmente en las interacciones puente de hidrógeno e hidrofóbicas entre las cadenas polipeptídicas. La urea puede formar interacciones puente de hidrógeno con los aminoácidos polares e interaccionar al mismo tiempo con los de naturaleza no polar. De esta manera, las interacciones atractivas entre las moléculas de urea con los restos aminoacídicos son más intensas que la que se establecen con las moléculas de agua. (Zangi *et al.*, 2009; Gálvez Mariscal *et al.*, 2013). Por lo mencionado, es probable que la urea también interfiera con las interacciones puente de hidrógeno que se establecen entre los grupos funcionales de las moléculas de proteínas y de polisacáridos. En este caso, la concentración empleada de urea es elevada, pero no lo suficiente para producir disociación

completa de los agregados de las moléculas de biopolímeros (Zhu *et al.*, 2017). En presencia de urea se evidenció un marcado descenso de la turbidez en todo el rango de pH respecto al de las dispersiones en agua destilada (Figuras 34a y b), observándose valores máximos a pH 4,4–4,5 para los tres concentrados. Además, la turbidez de CST80 fue significativamente mayor que la de CST65 y CST50 (Figura 34b). La disminución de la turbidez en presencia de urea sería consistente con la disociación de los agregados promovida por el agente caotrópico (Figura 34b). No obstante, el tratamiento térmico del ST a 80 °C, promovería un mayor grado de agregación debido al incremento en la intensidad del efecto hidrofóbico. En este contexto, durante el tratamiento térmico de dispersiones acuosas de proteínas, las interacciones hidrofóbicas se refuerzan a medida que se eleva la temperatura de tratamiento térmico, siendo más estabilizadas en el rango de temperatura 60–80 °C (Gálvez-Mariscal *et al.*, 2013).

En CST80, la presencia de agregados mediados por puentes disulfuro evidenciados por TSDS-PAGE, contribuirían a aumentar la resistencia contra el efecto disociador de la urea. En ese sentido, en presencia de DTT, se registró únicamente para CST80 una ligera disminución en los valores de turbidez respecto a la dispersión que contiene sólo el agente caotrópico, lo cual refuerza la contribución de los enlaces disulfuro a la estabilización de los agregados proteicos de CST80 (Figuras 34b y c).

1.2.2.6. Dependencia de la solubilidad acuosa de proteínas e hidratos de carbono con el pH

En base a lo mencionado en las secciones anteriores, la temperatura empleada en el tratamiento térmico tuvo una importante influencia en la composición química y las propiedades estructurales de los biopolímeros. Dado que los concentrados están constituidos principalmente por proteínas y polisacáridos (Tabla 8), en esta sección se evaluó el efecto del pH sobre la solubilidad acuosa de proteínas (S_P) e hidratos de carbono (S_{HC}); los resultados se muestran en la Figura 36. Para CST50, la S_P fue superior a 60% P/P en todo el rango del pH registrando el valor más bajo a pH 4,0; además, la S_{HC} fue similar en el rango de pH 5,0–7,0, pero evidenció una disminución a valores de pH menores a 5,0, con un valor mínimo a pH 3,0. Este último resultado se atribuiría a que los polisacáridos solubles del cotiledón y la cáscara del grano de soja que estarían presentes en el ST, contienen residuos de ácido galacturónico que tienen un pK_a cercano a 3,0 (Nakamura *et al.*, 2003; Porfiri y Wagner, 2018).

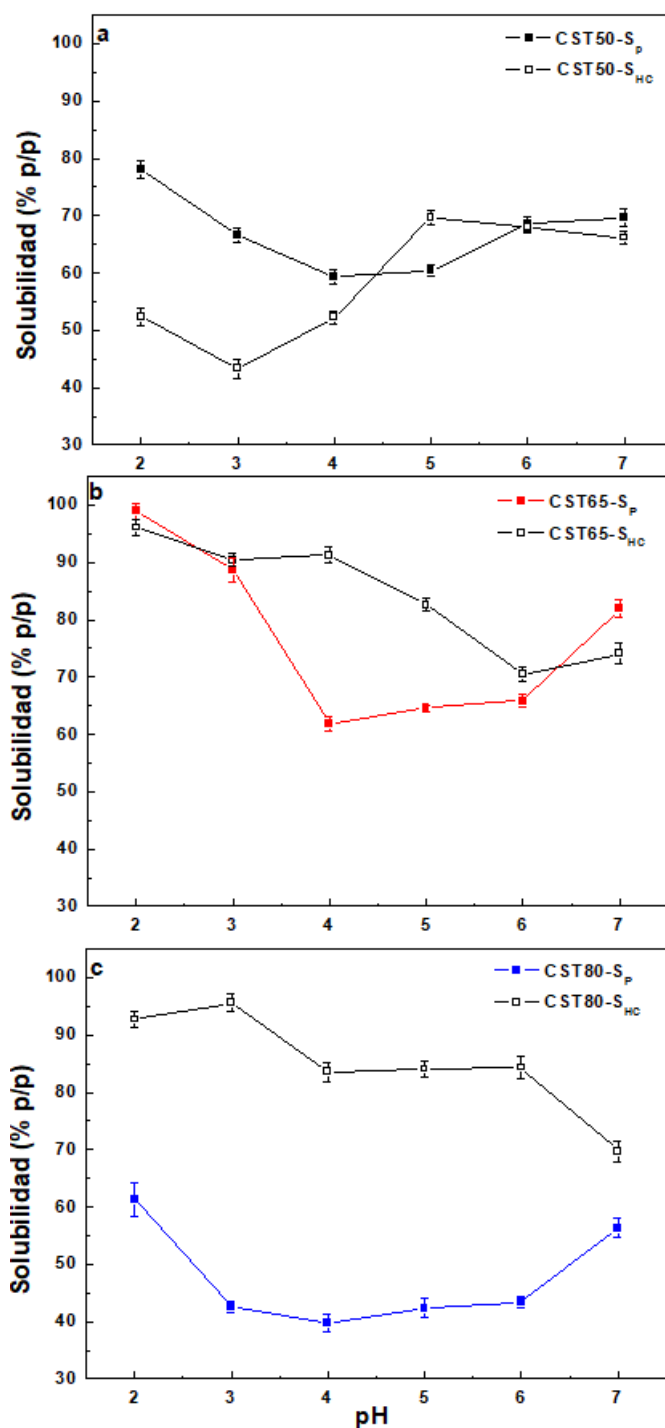


Figura 36: Efecto del pH sobre la solubilidad proteica (S_P) y de hidratos de carbono (S_{HC}) de los concentrados de suero de tofu obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu a presión reducida: a) 50 °C (CST50), b) 65 °C (CST65) y c) 80 °C (CST80). La concentración de muestra en las dispersiones acuosas fue de 0,1% P/P . Los valores se expresaron como el promedio de tres determinaciones independientes ($n=3$) $\pm$ desvío estándar.

Sin embargo, el efecto del pH sobre la S_P y S_{HC} para CST65 y CST80 fue sustancialmente diferente respecto al observado en CST50. Si bien para ambos concentrados

también se observó el valor más bajo de S_P a pH 4,0, los polisacáridos fueron altamente solubles a pH inferior a 5,0 (Figuras 36b y c). Para CST80, la S_P fue inferior al 45% P/P en el rango de pH 3,0–6,0; por el contrario, en el mismo rango de pH la S_{HC} exhibió valores superiores a 80 % P/P (Figura 36c).

Como se mencionó en la sección 1.1, el pH del ST fue $5,6 \pm 0,1$, el cual se incrementó durante la etapa de concentración (0,6–0,8 unidades de pH). En esta condición, las proteínas y los polisacáridos presentes en el ST exhiben una carga neta negativa y, por lo tanto, las asociaciones electrostáticas entre biopolímeros son relativamente débiles. De hecho, el potencial- ζ de los tres concentrados fue ligeramente negativo en el rango de pH 5,0–7,0 (Figura 35). Al aumentar la temperatura durante la etapa de concentración, es muy probable que el aumento de la intensidad del efecto hidrofóbico, la glicosilación incipiente y la formación de enlaces disulfuro promuevan principalmente la agregación de proteínas. Por lo tanto, las proteínas insolubles estarían poco asociadas a los polisacáridos (la fracción insoluble se enriquecen en proteína y empobrece en polisacáridos) cuando los concentrados se obtienen por tratamiento térmico a temperaturas más elevadas. Para corroborar esta hipótesis, en la Figura 37 se muestra el efecto del pH sobre la relación másica de carbohidrato a proteína en la fracción soluble de los concentrados. A valores de pH inferiores a 6,0, la fracción soluble se enriqueció en polisacáridos, mostrando claramente el orden $CST80 > CST65 > CST50$ ($p < 0,05$). Por lo tanto, CST80 estaría compuesto por agregados proteicos compactos de menor flexibilidad molecular, mediados principalmente por interacciones hidrofóbicas, por enlaces disulfuro y con menor asociación a polisacáridos. Esta observación sería consistente con los resultados obtenidos por TSDS-PAGE, FTIR y turbidez (Figuras 31, 32 y 34). Al mismo tiempo, el aumento notable de S_{CH} a pH inferiores a 5,0, que se evidenció en CST65 y CST80, se atribuiría a reacciones de glicosilación incipiente con péptidos y proteínas presentes en el ST, de acuerdo con un aumento del contenido de LNR (Tabla 8).

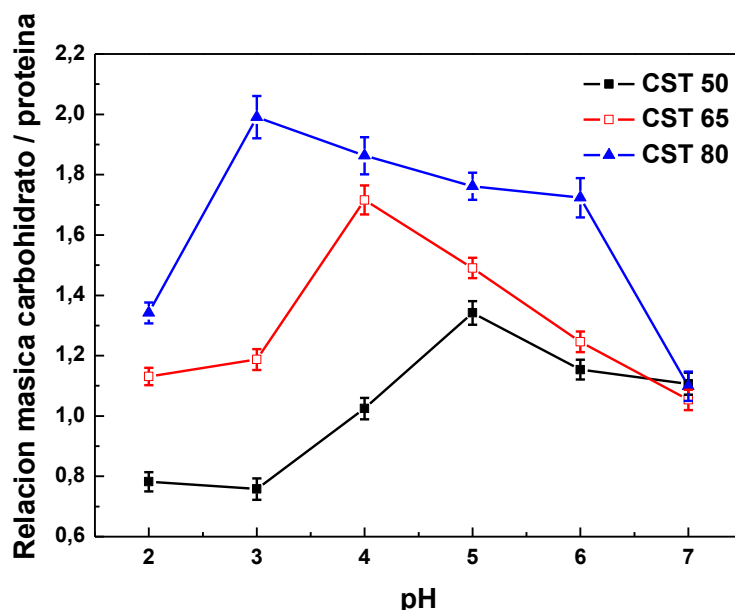


Figura 37: Efecto del pH sobre la relación másica carbohidratos/proteína en la fracción soluble de los concentrados de suero de tofu obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu a presión reducida a 50 °C (CST50), 65 °C (CST65) y 80 °C (CST80).

1.2.2.7. Evaluación del comportamiento superficial en la interfase agua/aire

El comportamiento superficial de las proteínas refleja las interacciones físicas entre proteína, las cuales están influenciadas por la composición de la interfase y la conformación que adopta la proteína en solución en la interfase aire-agua (Damodaran, 2006). En primer lugar, se midió la tensión superficial de equilibrio (γ_s) en dispersiones acuosas de los concentrados a distintos valores de pH, usando un tensiómetro automatizado de anillo de Du Noüy (sección 1.11.17.1). Todos los concentrados exhibieron buenas propiedades superficiales en la interfase aire/agua en todo el rango de pH; los valores de presión interfacial de equilibrio (π_s) oscilaron entre 29,5 y 31,5 mN/m (Tabla 10). Al evaluar el impacto del pH sobre π_s , se puede observar que todos los concentrados exhibieron valores máximos a pH 4,0 ($p < 0,05$); al mismo tiempo, a este valor de pH, π_s fue significativamente más bajo para CST80 respecto al de los otros concentrados (Tabla 10, $p < 0,05$). De acuerdo con las mediciones de turbidez en agua destilada, en el rango 4,0–4,5, se evidenció la máxima agregación o auto-asociación de los biopolímeros en todos los concentrados, que sería consistente con los valores de potencial- ζ cercanos a cero, en el rango de pH mencionado (Figuras 34a y 35). Para las proteínas, a un pH cercano al punto isoeléctrico predomina la contribución del efecto hidrofóbico, favoreciendo la adsorción de moléculas en la interfase aire/agua y, por ende, la reducción en la tensión

superficial. Sin embargo, la capacidad interfacial de adsorción de las proteínas también está relacionada con otros factores, como la fuerza iónica, el tamaño molecular y las interacciones con los polisacáridos (Pezennec *et al.*, 2000; Rodriguez Patino y Pilosof, 2011).

Tabla 10: Efecto del pH sobre la presión interfacial de equilibrio (π_s) de los concentrados de suero de tofu obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu a presión reducida a 50°C (CST50), 65 °C (CST65) y 80 °C (CST80).

pH	π_s (mN/m)		
	CST50	CST65	CST80
2,0	30,60 ± 0,10 ^{b,A}	30,38 ± 0,07 ^{c,A}	30,34 ± 0,10 ^{a,A}
3,0	30,30 ± 0,08 ^{a,A}	30,11 ± 0,06 ^{b,A}	30,24 ± 0,08 ^{a,A}
4,0	31,40 ± 0,08 ^{d,A}	31,26 ± 0,06 ^{e,A}	31,02 ± 0,06 ^{c,B}
5,0	31,05 ± 0,08 ^{c,A}	30,75 ± 0,10 ^{d,B}	30,65 ± 0,09 ^{b,B}
6,0	30,30 ± 0,05 ^{a,A}	30,67 ± 0,07 ^{d,B}	30,26 ± 0,06 ^{a,A}
7,0	30,15 ± 0,06 ^{a,A}	29,49 ± 0,07 ^{a,B}	30,30 ± 0,08 ^{a,A}

Los valores de presión superficial se expresaron como el promedio de tres mediciones independientes ($n = 3$) ± desvío estándar. Los valores promedio en una misma columna seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher. Los valores promedio en una misma fila seguidos de letras mayúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según lo determinado por la prueba de Fisher.

En este contexto, para CST80, la leve reducción de la actividad superficial a pH 4,0 se atribuiría a la presencia de un mayor contenido de agregados de proteínas insolubles, de acuerdo con la menor S_p y la mayor relación másica entre carbohidrato y proteína en la fracción soluble (Figuras 36c y 37).

Además, se realizaron ensayos de reología superficial a través de la evolución de la viscosidad compleja superficial (η^*) frente al tiempo (sección 1.11.17.2, Baldursdottir *et al.*, 2010). Los resultados se muestran en la Figura 38. Para CST50, η^* se incrementó rápidamente, llegando a valores máximos luego de 15 minutos, independientemente del pH, debido a que las proteínas están poco agregadas y por lo tanto se adsorben más rápidamente en la interfase (Figuras 34a y 38a). Por el contrario, la influencia del pH sobre el comportamiento reológico interfacial fue sustancialmente diferente en CST65 y CST80, donde los valores de η^* al final

del ensayo fueron más elevados que los de CST50. Este resultado fue especialmente evidente para CST65 a pH 3,0 y 4,0 y para CST80 a pH 4,0 y 5,0 (Figuras 38b y 38c).

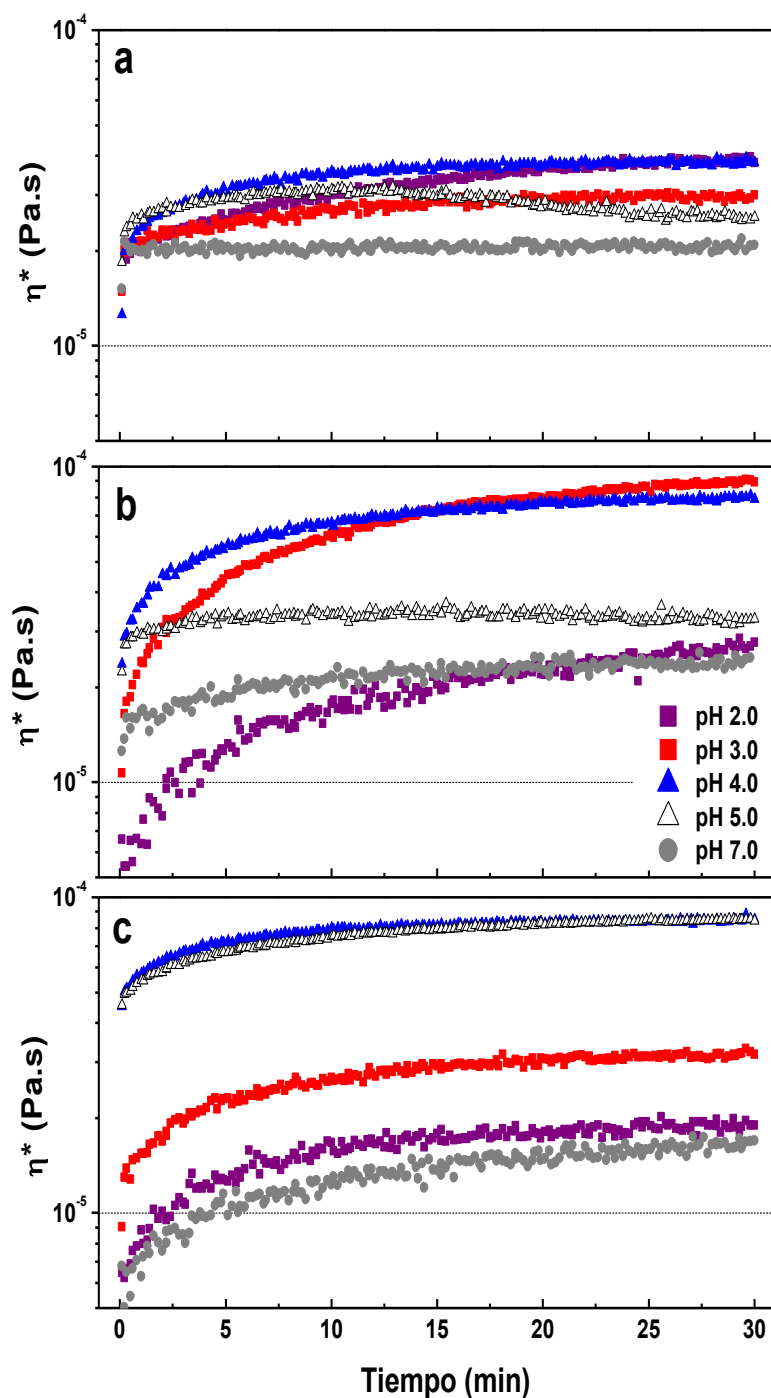


Figura 38: Perfiles interfaciales de viscosidad compleja (η^*) en función del tiempo, en la interfase aire/agua para los concentrados de suero de tofu a diferentes pH: a) CST50, b) CST65 y c) CST80. Los ensayos se realizaron a una concentración equivalente de proteína (1,0 % p/p). Los valores se expresaron como el promedio de tres mediciones independientes ($n=3$) $\pm$ desvío estándar.

De acuerdo con Baldursdottir *et al.* (2010), en los ensayos de reología superficial, los valores de η^* son especialmente sensibles a las interacciones intermoleculares que se establecen entre los biopolímeros adsorbidos en la interfase aire/agua. La formación de películas de mayor viscoelasticidad en CST65 y CST80 sería atribuida a la adsorción de los agregados, cuyas interacciones son más intensas a valores de pH donde la carga neta es nula (pH 4,0, Figura 34). Para CST50, esto no sería posible porque este concentrado está constituido por proteínas con un menor grado de agregación (Figura 34a).

1.2.2.8. Evaluación de las propiedades espumantes

En esta sección se evaluaron las propiedades espumantes de los concentrados proteicos de suero de tofu en función del pH. Todas las dispersiones acuosas de las muestras exhibieron una alta capacidad espumante a pH 4,0 y 5,0, mostrando valores máximos de overrun a pH 4,0. Además, se observó una sustancial reducción de la capacidad espumante a los demás valores de pH (Figura 39). Como se mencionó anteriormente, todos los concentrados mostraron los valores más elevados de π_s a pH 4,0 y 5,0 (Tabla 10), por lo que la capacidad espumante estaría directamente ligada a una mayor actividad superficial de los biopolímeros. Además, a pH 4,0, CST50 exhibió la mayor capacidad espumante (overrun > 1900%), de manera similar a la albúmina de huevo, que tiene una excelente capacidad de formación de espumas a pH entre 4,0 y 5,0 y a una concentración de proteína similar a la empleada en este trabajo (1,0 % P/P) (Lomakina y Míková, 2006). Teniendo en cuenta los estudios de FTIR (Figura 32), turbidez en agua destilada (Figura 34a) y solubilidad proteica (Figura 36a), la muestra CST50 está constituida por proteínas con un menor grado de agregación y una mayor flexibilidad estructural, siendo clave ambas características para la mejora en la capacidad espumante (Damodaran, 2006). En los concentrados obtenidos a mayor temperatura (CST65 y CST80), a pH 4,0 se observó una disminución de π_s , que sólo fue significativa para CST80 (Tabla 10, $p < 0,05$) y que influiría negativamente en la capacidad espumante.

Para todos los concentrados, la estabilidad de las espumas, evaluada a través de la determinación del tiempo medio de colapso ($t_{1/2}$), fue máxima a pH 4,0 (Figura 39b). Como se mencionó anteriormente, a pH 4,0 los concentrados exhibieron un potencial- ζ cercano a cero (Figura 35). De acuerdo a Yu y Damodaran (1991), la estabilidad de las espumas preparadas con dispersiones acuosas de proteínas es mayor a un pH cercano al punto isoelectrico, debido que el debilitamiento de la repulsión electrostática entre las moléculas adsorbidas permite la estabilización de la película interfacial. Este argumento también sería válido para evaluar la

estabilidad de las espumas de muestras de composición sustancialmente más compleja que la de las proteínas aisladas. Por lo tanto, en los concentrados, el debilitamiento de la repulsión electrostática que promueve la agregación o auto-asociación de los biopolímeros tendría un rol clave en la estabilización de espumas.

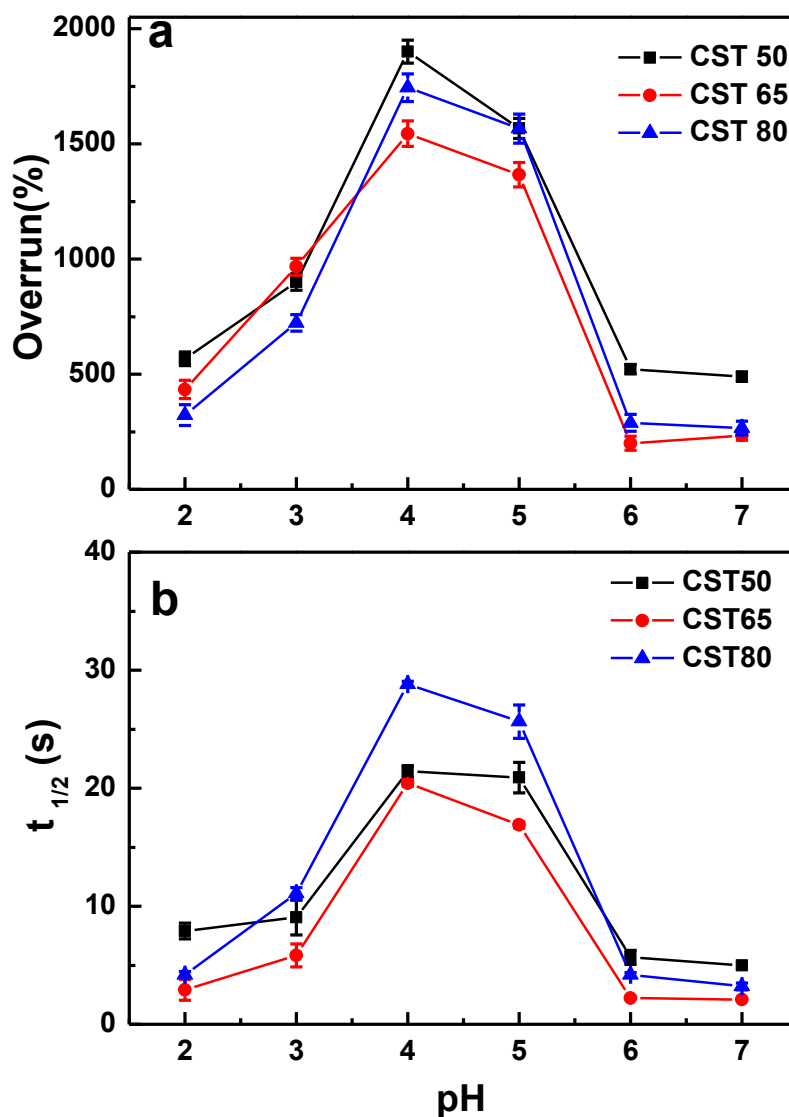


Figura 39: Efecto del pH sobre a) el Overrun (%) y b) el tiempo medio de colapso ($t_{1/2}$) de las espumas preparadas con dispersiones acuosas (1,0% proteína P/P) de concentrados de suero de tofu obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu a presión reducida a 50°C (CST50), 65 °C (CST65) y 80 °C (CST80). Los parámetros se expresaron como el promedio de tres determinaciones independientes ($n=3$) $\pm$ desvío estándar.

A pH 4,0 y 5,0, la estabilidad de las espumas presentó el siguiente orden decreciente CST80 > CST65 ~ CST50 ($p < 0,05$). En CST80, la relación másica carbohidrato/proteína en la

fracción soluble fue la más elevada a estos valores de pH (Figura 37). Aunque en la fracción soluble los polisacáridos podrían retrasar el adelgazamiento de la película interfacial y por ende, el drenado del líquido y posterior colapso, la mayor estabilización de las espumas de CST80 se atribuiría principalmente a la adsorción de agregados más compactos en la interfase aire/agua y la formación de una película interfacial con alta viscoelasticidad. Los resultados obtenidos están de acuerdo con los reportados previamente por Murray *et al.* (2011) en espumas estabilizadas por dispersiones acuosas de proteínas solubles y partículas insolubles de proteínas.

1.2.3. Composición, propiedades estructurales, superficiales y espumantes de concentrados obtenidos a partir suero de tofu neutralizado

En esta sección se analizará la composición, las propiedades estructurales, el comportamiento superficial en la interfase agua/aire y las propiedades espumantes de los concentrados de suero de tofu obtenidos a partir del ST filtrado y posteriormente neutralizado (STN) por ajuste de pH a 7,0 con solución de NaOH 1,0 M antes de la etapa de concentración. Como se mencionó en la sección 1.1.2, el tratamiento térmico a presión reducida del STN se realizó a 50 °C y 80 °C para obtener los concentrados CST50_{aj} y CST80_{aj}, respectivamente. Debido al bajo contenido de sólidos totales de ST, el volumen necesario de NaOH 1,0 M necesario para el ajuste de pH fue muy bajo (~ 3,0 mL/L ST). Por consiguiente, la composición química de ambos sueros (ST y STN) fue similar (Tablas 7 y 11). Además, aunque el contenido de Na⁺ del STN no se determinó experimentalmente, la concentración aproximada es de 0,07 g/L, de acuerdo con el volumen empleado de NaOH 1,0 M en la neutralización del ST.

Tabla 11: Composición química del suero de tofu filtrado y neutralizado (STN)

Sólidos totales (g/L)	Proteína bruta (N×6,25) (g/L)	Hidratos de carbono totales (g/L)	Cenizas (g/L)	Calcio total (g/L)
20,7 ±0,1	2,9± 0,1	8,5± 0,2	4,2 ± 0,4	0,28 ± 0,1

1.2.3.1. Rendimiento y composición química

Los concentrados obtenidos a partir del STN presentaron un rendimiento de obtención 0,61 y 0,54 % P/P para CST50_{aj} y CST80_{aj}, respectivamente. El rendimiento fue ligeramente mayor respecto al de CST50 y CST80 (sección 1.2.2.1), sin embargo, las diferencias observadas no fueron significativas ($p>0,05$).

La composición química de CST50_{aj} y CST80_{aj} se muestra en la Tabla 12. En este caso, al igual que en los concentrados obtenidos por concentración del ST sin ajuste previo de pH, los porcentajes en base seca de proteína cruda ($N \times 6,25$), cenizas y calcio total se incrementaron significativamente con el aumento de la temperatura en la etapa de tratamiento térmico ($p<0,05$). Este resultado está directamente ligado a la interacción Ca^{2+} -proteína en los concentrados (sección 1.2.1). En relación con el contenido de hidratos de carbono totales y de fibra dietaria total, también se evidenció un leve enriquecimiento en CST80_{aj}; la marcada diferencia entre el contenido de hidratos de carbono totales ($\sim 20\% P/P$) y de fibra dietaria total puede atribuirse, como se mencionó anteriormente, a los distintos métodos analíticos empleados (sección 1.2.2.1). Además, aunque el contenido de LT fue similar en ambos concentrados ($p>0,05$), el de LNR fue significativamente mayor en de CST80_{aj} ($p<0,05$), acorde a un mayor grado de glicosilación.

Al analizar comparativamente la composición química de CST50_{aj} y CST80_{aj} respecto a la de los concentrados obtenidos a partir del ST sin ajuste previo de pH (CST50 y CST80) se observó para los primeros una marcada disminución en el contenido de cenizas y calcio total. El porcentaje de cenizas de CST50_{aj} y CST80_{aj} se redujo 2,4 y 2,3 veces respecto al de CST50 y CST80, respectivamente; además, la reducción del porcentaje de calcio total fue de 1,7 veces para ambos concentrados (Tablas 8 y 12).

Con respecto al contenido de proteína bruta, se observaron diferencias importantes en los concentrados preparados por tratamiento térmico a mayor temperatura: el porcentaje obtenido para CST80_{aj} fue 1,2 veces menor que el de CST80. Finalmente, CST50_{aj} y CST80_{aj} mostraron valores significativamente más altos en el contenido de hidratos de carbono totales y los porcentajes de fibra dietaria total fueron sólo levemente superiores al de los concentrados obtenidos a partir del ST sin ajuste previo de pH (Tablas 8 y 12).

Tabla 12: Composición química (% P/p, expresada en base seca) de los concentrados de suero de tofu obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu neutralizado a presión reducida a 50 °C (CST50_{aj}) y 80 °C (CST80_{aj}). El porcentaje de humedad (P/p) de CST50_{aj} y CST80_{aj} fue 9,40 ± 0,1 y 9,80 ± 0,2, respectivamente.

Composición química	CST50 _{aj}	CST80 _{aj}
Proteína cruda (N×6.25)	36,1 ± 0,2 ^a	39,7 ± 0,4 ^b
Lisina total (LT)	2,7 ± 0,2 ^a	2,8 ± 0,3 ^a
Lisina no reactiva (LNR)	13,1 ± 0,3 ^a	16,3 ± 0,5 ^b
Carbohidratos totales.	48,6 ± 0,2 ^a	49,9 ± 0,5 ^b
Fibra dietaria total.	27,4 ± 0,5 ^a	31,5 ± 0,3 ^b
Cenizas	5,4 ± 0,3 ^a	7,0 ± 0,2 ^b
Calcio total	2,7 ± 0,3 ^a	3,9 ± 0,2 ^b

Los parámetros de composición se expresaron como el promedio de tres mediciones independientes ($n = 3$) ± desvío estándar. LNR se expresó como % P/p en LT. Los valores promedio en una misma fila seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher.

La diferencia en la composición química entre los concentrados de suero de tofu preparados a partir de ST y STN, especialmente evidente para los preparados a 80 °C (CST80 y CST80_{aj}) puede atribuirse a distintos factores: i) La intensidad de la repulsión electrostática entre las moléculas de biopolímeros es más intensa en el STN, debido a una mayor magnitud de la carga neta negativa, lo cual afecta la interacción durante la etapa de concentración, ii) la presencia de Na⁺, aún en cantidades bajas, afecta los equilibrios de disociación ácido-base de los restos aminoacídicos de glutamato y aspartato y de asociación de estos restos con el Ca²⁺. Durante la etapa de concentración a pH más elevado y en presencia de Na⁺, el grado de asociación del Ca²⁺ con los biopolímeros sería menor, y por ende habría una mayor pérdida del ión divalente durante la diálisis, obteniendo concentrados con menor contenido de calcio total. Al mismo tiempo, los péptidos de bajo peso molecular tendrían una menor capacidad de interacción con los polisacáridos mediante glicosilación, favoreciendo su pérdida durante la diálisis, acorde a la disminución en el contenido de proteína bruta mencionado anteriormente. En este contexto, los contenidos de LT y LNR de CST50_{aj} y CST80_{aj} fueron inferiores respecto a los concentrados obtenidos a partir del ST sin ajuste previo de pH. Por ejemplo, para los concentrados obtenidos a mayor temperatura, los contenidos de LT y LNR de CST80_{aj} fueron 24% y 55% menor, respectivamente, a los de CST80 (Tablas 8 y 12).

1.2.3.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con tricina (TSDS-PAGE)

Los perfiles electroforéticos de los concentrados, evaluados por TSDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras se muestra en la Figura 40. En condiciones no reductoras (Figura 40b) ambos concentrados presentaron una composición polipeptídica similar, con la presencia de las subunidades α y α' de la β -conglucina (60-90 kDa), la subunidad de la lectina (~ 35 kDa) y polipéptidos de bajo peso molecular (BPM, ~ 14 kDa). Aunque la banda correspondiente al KTI no se observó en estas condiciones, los perfiles electroforéticos evidenciaron la presencia de un polipéptido en el rango 21–29 kDa. No obstante, en CST80_{aj} se evidenció claramente la presencia de agregados de alto PM en la parte superior del gel y una atenuación de la intensidad de las bandas de la subunidad α y de la lectina respecto a las del perfil electroforético de CST50_{aj}. Los agregados de CST80_{aj} están estabilizados principalmente por enlaces disulfuro, dado que desaparecieron en presencia de β -ME (Figura 40a). Además, en condiciones reductoras, se observaron las bandas correspondientes a la subunidad de la lectina y de BPM; al mismo tiempo, se evidenció la desaparición del polipéptido en el rango 21–29 kDa y la presencia de la banda correspondiente a KTI (~ 20 kDa). Debido a la complejidad inherente a la composición del ST, el polipéptido observado en el rango 21–29 kDa sería atribuido a agregados de BPM o alternativamente, agregados de KTI con péptidos de bajo peso molecular por medio de enlaces disulfuro. El análisis comparativo entre los perfiles electroforéticos de los concentrados obtenidos a partir del ST y STN (Figuras 31 y 40) indica que, en términos generales, los concentrados evidenciaron una composición polipeptídica similar (subunidades de lectina, subunidades α y α' de β -conglucina, KTI y BPM), con una mayor tendencia a la formación de agregados de alto peso molecular y estabilizados por puentes disulfuro en los obtenidos a mayor temperatura (80 °C).

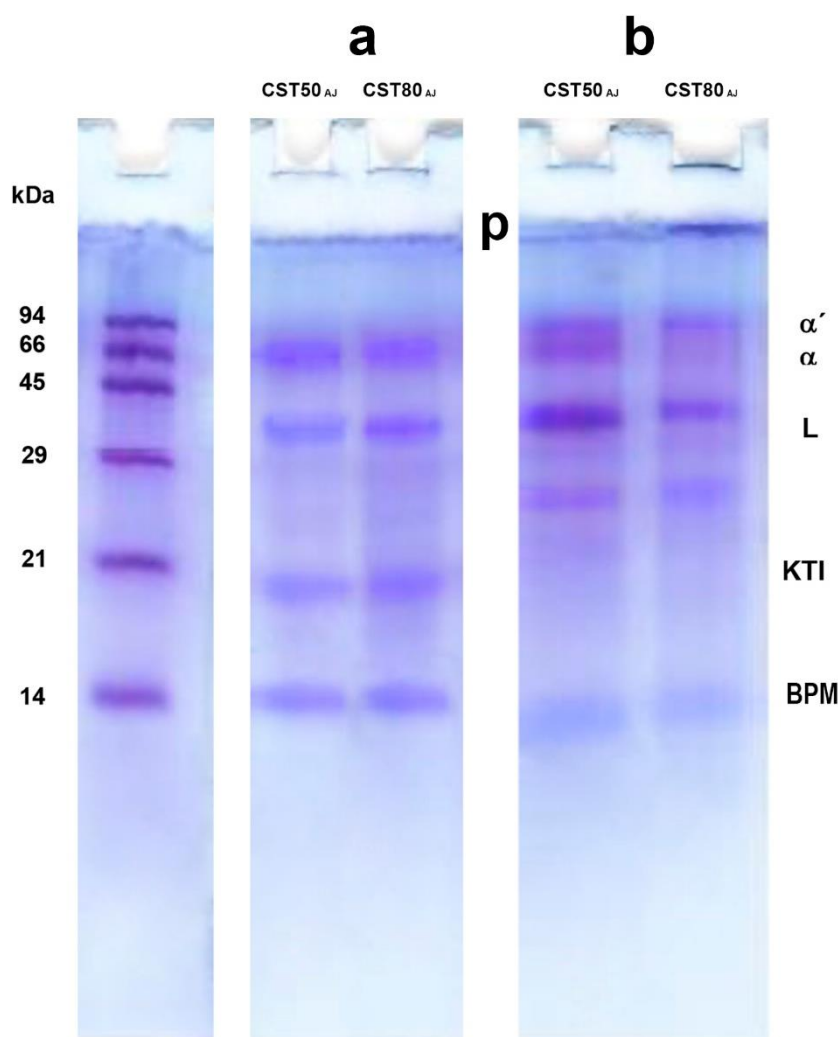


Figura 40: Perfiles TSDS-PAGE de los concentrados proteicos de suero de tofu obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu neutralizado a presión reducida a 50°C (CST50_{aj}) y 80°C (CST80_{aj}): a) condiciones reductoras (en presencia de β-ME). b) condiciones no reductoras (en ausencia de β-ME). Marcadores de peso molecular (PM): α-lactoalbúmina, 14,4 kDa; inhibidor de tripsina, 20,1 kDa; anhidrasa carbónica, 30,0 kDa; ovoalbúmina, 43,0 kDa; albúmina sérica bovina, 67,0 kDa y fosforillos b, 94,0 kDa. La letra P indica la presencia de agregados proteicos en la parte superior del gel apilador.

1.2.3.3. Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)

En esta sección, las diferencias estructurales entre los concentrados CST50_{aj} y CST80_{aj} se evaluaron por FTIR (Figura 41). Al igual que en la sección 1.2.2.3, los espectros se analizaron en la región denominada *fingerprint* (1800–800 cm⁻¹), en la cual todos los concentrados exhibieron las bandas típicas de amidas de proteínas: amida I (1647 cm⁻¹), amida II (1545 cm⁻¹), amida II' (1390–1431 cm⁻¹) y amida III (1271–1311 cm⁻¹) y las transiciones a

1044, 1073 y 1143 cm^{-1} correspondientes a los polisacáridos (Černá *et al.*, 2003, Nakamura *et al.*, 2006; Singh, 2000).

La banda a 1545 cm^{-1} (amida II) y el pico a 1614 cm^{-1} correspondería a la flexión del enlace NH del grupo amido de los residuos aminoácidos de glutamina (Kong & Yu, 2007), registraron una atenuación en CST80_{aj} (Figura 41a) indicando la reducción en la movilidad de la cadenas laterales de aminoácidos al incrementar la temperatura de obtención.

Los espectros FTIR no exhiben diferencias respecto a las muestras sin ajuste de pH (figura 41), registrando ligeras variaciones en los números de onda de adsorción. En la Figura 41b se observa que en la zona 1680-1520 cm^{-1} , las bandas correspondientes a las amidas I y II presentan diferencias entre las muestras, lo cual se relaciona con la libertad en el movimiento de los enlaces presentes en un grupo funcional y a las interacciones con otros grupos funcionales de la misma molécula o una vecina (Goormaghtigh *et al.*, 2006). El concentrado obtenido a 50°C con pH ajustado presenta una estructura secundaria formada por α -hélice (1656 cm^{-1} , amida I; 1545 cm^{-1} , amida II), β -sheet (1620–1641 cm^{-1} , amida I; 1563 cm^{-1} , amida II) y, en menor proporción por, β -turn (1670 cm^{-1} , amida I) (Oberg *et al.*, 2003). Estos resultados indican que las muestras obtenidas a 50°C con y sin ajuste de pH no presentan diferencias en sus estructuras secundarias (Figuras 32a y 41a). En la muestra CST80_{aj}, se observan cambios en los picos 1645 cm^{-1} y 1641 cm^{-1} (Figura 41b), estas modificaciones indican que las estructuras secundarias de las proteínas presentan un desorden (From y Bowler, 1998; Kong y Yu, 2007). El concentrado obtenido a 80°C sin pH ajustado, presentó las mismas modificaciones en sus estructuras secundarias (Figuras 41b), lo que estaría indicando que el ajuste previo del pH no induce variaciones en las estructuras secundarias de las proteínas. Sin embargo, el incremento de la temperatura de concentración a 80°C disminuyó la intensidad de las bandas de adsorción (Figuras 41) y provocó la ausencia de la banda 1670 cm^{-1} (Figuras 32b y 41b). Como se había mencionado en la sección 1.2.2.3, la disminución de la intensidad de las bandas de adsorción es un resultado indicativo de que las estructuras secundarias de las proteínas del suero de tofu se verían afectadas por el incremento de la intensidad de las interacciones entre proteína-proteína y proteína-carbohidratos y los procesos de glicosilación incipiente (Ingrassia *et al.*, 2017).

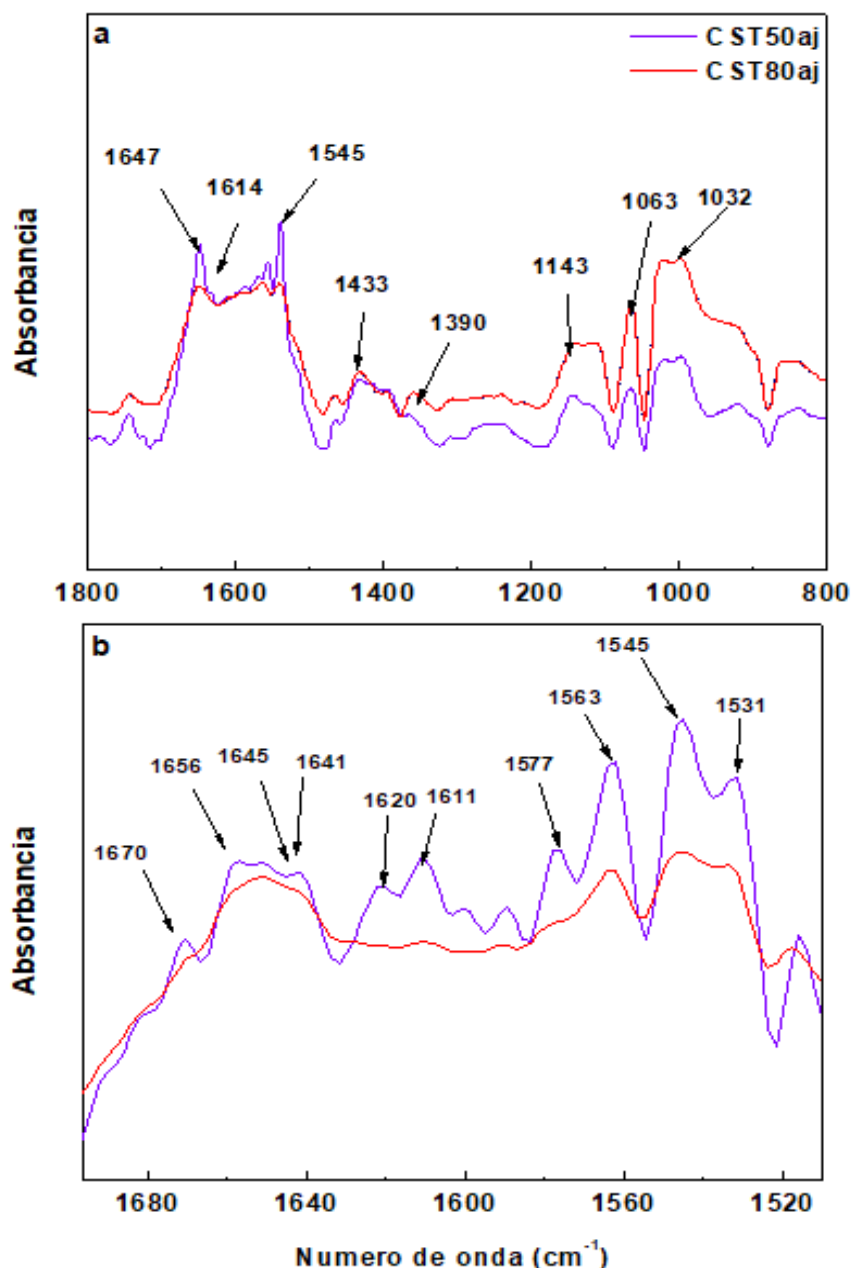


Figura 41: a) Espectros FTIR ($800\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$) y b) espectros FTIR (Zonas de amida I-II, $1520\text{--}1680\text{ cm}^{-1}$ luego de una deconvolución espectral) de los concentrados de suero de tofu obtenidos a por tratamiento térmico del suero de tofu neutralizado a presión reducida a 50° C (CST50_{aj}) y 80° C (CST80_{aj}). Los espectros obtenidos son el resultado de 45 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} .

1.2.3.4. Análisis termogravimétrico (TGA)

En la Figura 42 se observan los perfiles diferenciales de degradación térmica de los concentrados CST50_{aj} y CST80_{aj}. Además, los parámetros de degradación obtenidos a partir de los perfiles se muestran en la Tabla 13. Al igual que en la sección 1.2.2.4, los perfiles se

dividieron en tres zonas (I, II y III) en el rango 150–450 °C. Como se mencionó anteriormente, los picos observados a temperaturas inferiores a 150 °C fueron consistentes con la pérdida de humedad de las muestras (Park y Bell, 2004). En la zona I (150–260 °C) correspondiente a la descomposición de las proteínas (Kadam *et al.*, 2013), se observó un pico en el rango 200–225 °C, aunque sin diferencias significativas entre las T_p ($p > 0,05$). No obstante, $\Delta m \%$ presentó el orden creciente $CST80_{aj} < CST50_{aj}$ ($p < 0,05$), acorde a un leve incremento de la estabilidad térmica de las proteínas de $CST80_{aj}$.

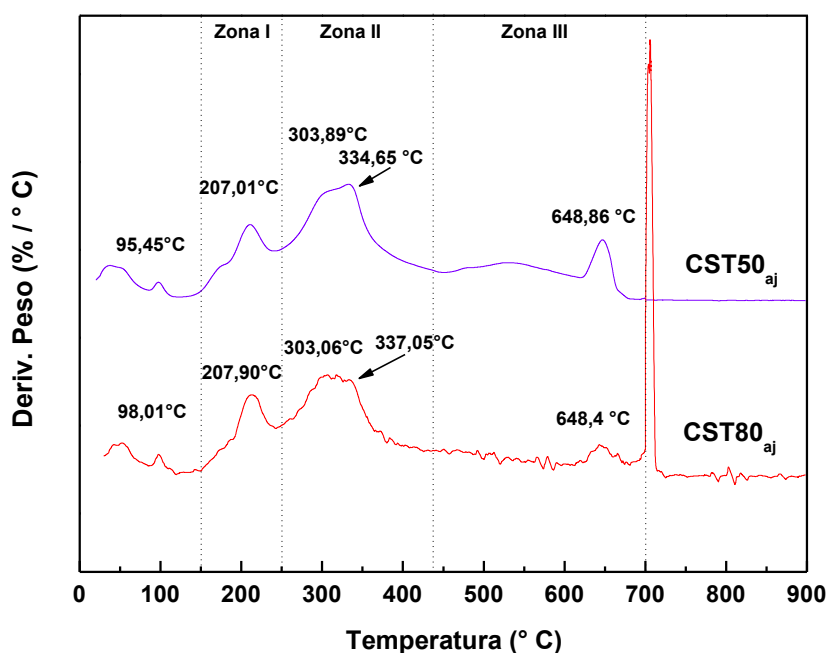


Figura 42: Perfiles diferenciales de degradación térmica de concentrados de suero de tofu, obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu neutralizado a presión reducida a 50 °C ($CST50_{aj}$) y 80 °C ($CST80_{aj}$). Rango de temperatura: 20–700 °C (atmósfera de nitrógeno); 700–900 °C (atmósfera de aire). Velocidad de calentamiento $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$

En la zona de degradación de los polisacáridos (zona II), para ambos concentrados se observaron dos picos superpuestos, a 303–305 °C y a 334–337 °C; para el primero no se observaron diferencias significativas en la T_p ($p > 0,05$) en tanto que para el segundo pico, la T_p fue ligeramente superior para $CST50_{aj}$, con un $\Delta m\%$ menor ($p < 0,05$) respecto a $CST80_{aj}$. En la zona III entre 648 a 649 °C se observó un pico adicional, que corresponde a los productos de la degradación térmica de los biopolímeros (proteínas y polisacáridos) en ambos concentrados. La pérdida de masa parcial para $CST50_{aj}$ y $CST80_{aj}$ fue de 83,9 y 63,8% respectivamente, lográndose con la incorporación de aire a 700 °C la oxidación completa. La diferencia del

porcentaje de pérdida de masa (~ 20%) entre los dos concentrados en atmósfera de nitrógeno y al final del ensayo es indicativo de un incremento de la estabilidad de CST80_{aj} a la termodegradación, la cual estaría ligada a un aumento en la concentración de calcio y a un mayor grado de agregación proteica (Tabla 9, Figuras 40 y 41)

Tabla 13: Parámetros de termodegradación obtenidos por análisis termo-gravimétrico (TGA) de concentrados de suero de tofu obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu neutralizado a presión reducida a 50 °C (CST50_{aj}), 65 y 80 °C (CST80_{aj}). En cada zona de termodegradación de la curva derivada del TGA (Figura 18), se obtuvieron las temperaturas de pico (Tp °C) y la pérdida parcial de masa (Δm , %).

Zona	Parámetros	Muestras	
		CST50 _{aj}	CST80 _{aj}
Zona I (150–260 °C)	Tp 1	207,01±0,3 ^a	207,90 ± 0,4 ^a
	$\Delta m1$	27,87 ± 0,5 ^b	25,97± 0,6 ^a
Zona II (260–430°C)	Tp 2	303,89± 0,4 ^a	303,06 ± 0,6 ^b
	Tp 2'	339,8 ± 0,2 ^b	331,0 ± 0,3 ^a
	Tp2''	Sin pico	Sin pico
	$\Delta m2$	50,5 ± 0,6 ^b	41,39 ± 0,4 ^b
Zona III (430–700 °C)	Tp 3	648,8±0,2 ^a	648,4±0,3 ^a
	$\Delta m3$	4,0± 0,2 ^b	1,6 ± 0,1 ^a

Los valores promedio en una misma fila seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes (p <0,05) según lo determinado por la prueba de Fisher.

Por otro lado, si se comparan las estabilidades térmicas de CST50_{aj} y CST80_{aj} con las de los concentrados obtenidos a partir del ST sin ajuste previo de pH (CST50 y CST80), los primeros evidenciaron una menor estabilidad térmica y un aumento en la pérdida de masa durante el tratamiento térmico. En la zona I, la cual se relaciona con la degradación térmica de las proteínas, para los CST50_{aj} y CST80_{aj} la Tp fue 20°C menor en relación con las observadas en CST50 y CST80, con una mayor pérdida asociada de masa. Con respecto a la degradación de los polisacáridos en la zona II, las temperaturas de los picos fueron similares, pero con una pérdida mayor de masa en los concentrados CST50_{aj} y CST80_{aj} (Tablas 9 y 13). Estos resultados reflejan el rol estabilizante del calcio frente a la descomposición térmica de los

biopolímeros, dado que el contenido del mineral fue significativamente superior en los concentrados obtenidos a partir del ST sin ajuste previo de pH (Tablas 8 y 12).

1.2.3.5. Dependencia de la turbidez y el potencial- ζ con el pH

En esta sección se evaluó el impacto del pH sobre la turbidez de dispersiones acuosas de CST50_{aj} y CST80_{aj} en presencia de urea 6,0 M y urea 6,0 M con adición de DTT (30mM). En presencia de agua (Figura 43a), al inicio del ensayo, ambas dispersiones presentaron una apariencia turbia, lo cual indica la presencia de partículas insolubles agregadas. Al descender el pH se registró un aumento gradual en la absorbancia obteniéndose los valores máximos entre 4,5 y 4,6 para CST50_{aj} y CST80_{aj}, respectivamente. Como se mencionó anteriormente, un aumento de la turbidez indica un debilitamiento de la repulsión electrostática que promueve la asociación entre biopolímeros. En el rango de pH 4,2–4,6, CST80_{aj} registró un leve incremento en la turbidez lo cual estaría indicando un mayor grado de agregación.

Además, se determinó el potencial- ζ de las dispersiones en el rango de pH 2,0–7,0 (Figura 44). En el rango de pH 5,0–7,0 se observaron valores negativos de potencial- ζ y entre 3,0–2,0 la carga fue positiva y exhibieron una carga neta cercana a cero a pH 4,0. Los resultados estarían asociados al mayor estado de agregación observado en el rango de pH 4,0–4,5 en los ensayos de turbidez (Figura 43a). La diferencia de potencial- ζ entre los concentrados se atribuiría a la cantidad de grupos ionizables y los valores de pK_a asociados a estos grupos en las moléculas de proteínas y polisacáridos, además de la presencia de calcio (Carneiro-Da-Cunha *et al.*, 2011; Malhotra y Coupland, 2004).

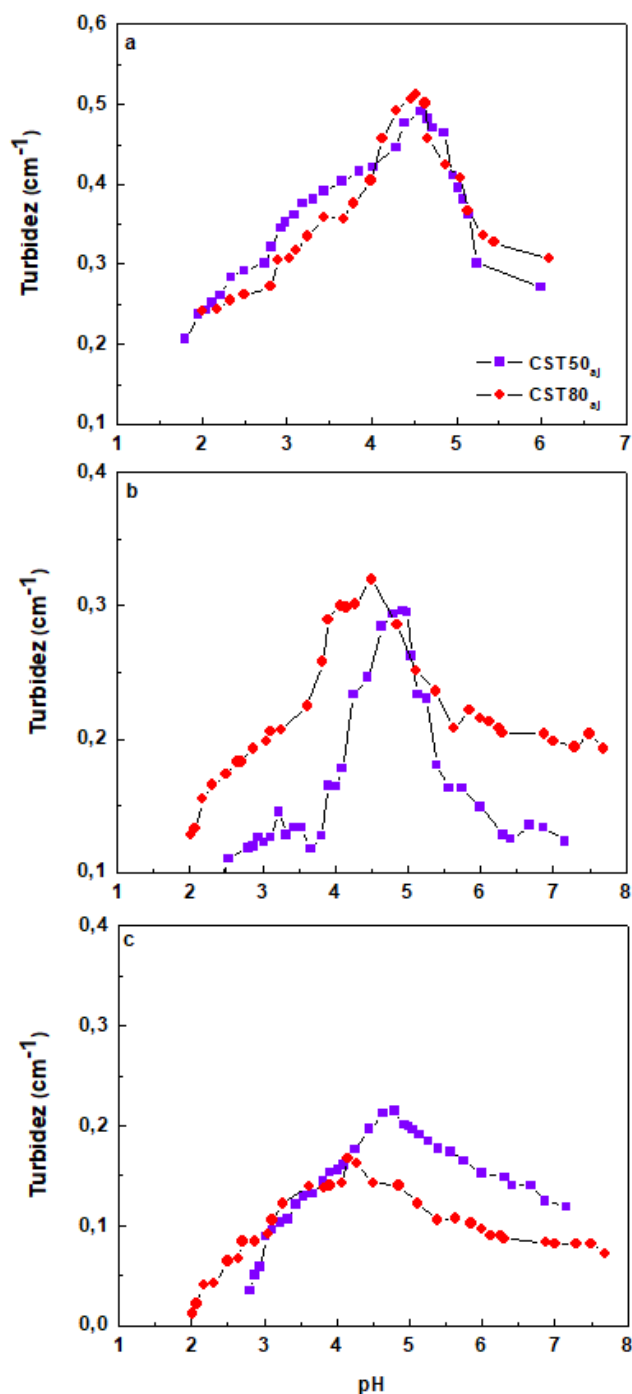


Figura 43: Efecto del pH sobre la turbidez de dispersiones acuosas (0,1 % P/P) de concentrados de suero de tofu obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu neutralizado a presión reducida a 50 °C (CST50_{aj}) y 80 °C (CST80_{aj}): a) en agua destilada ;b) en solución de urea 6,0 M; c) en solución de urea 6,0 M + ditiotreitól (DTT, 30 mM).

La turbidez de las dispersiones de los concentrados con el pH en presencia de urea 6M, disminuyó en todo el rango de pH en relación con la turbidez observada en agua destilada

(Figuras 43a y 43b). No obstante, los valores de turbidez de CST80_{aj} fueron superiores a los de CST50_{aj}, con un corrimiento del máximo de turbidez hacia valores más bajos de pH. Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que la urea como agente caotrópico desestabiliza el núcleo hidrofóbico de las proteínas y disocia agregados proteicos, interfiriendo principalmente en las interacciones puente de hidrógeno e hidrofóbicas entre las cadenas polipeptídicas (Zangi *et al.*, 2009). Por lo tanto, la reducción en la turbidez en presencia de urea 6,0 M es consistente con la disociación de los agregados (Figura 43b). El tratamiento térmico a 80 °C promovería un mayor grado de agregación para CST80_{aj} por la intensificación del efecto hidrofóbico.

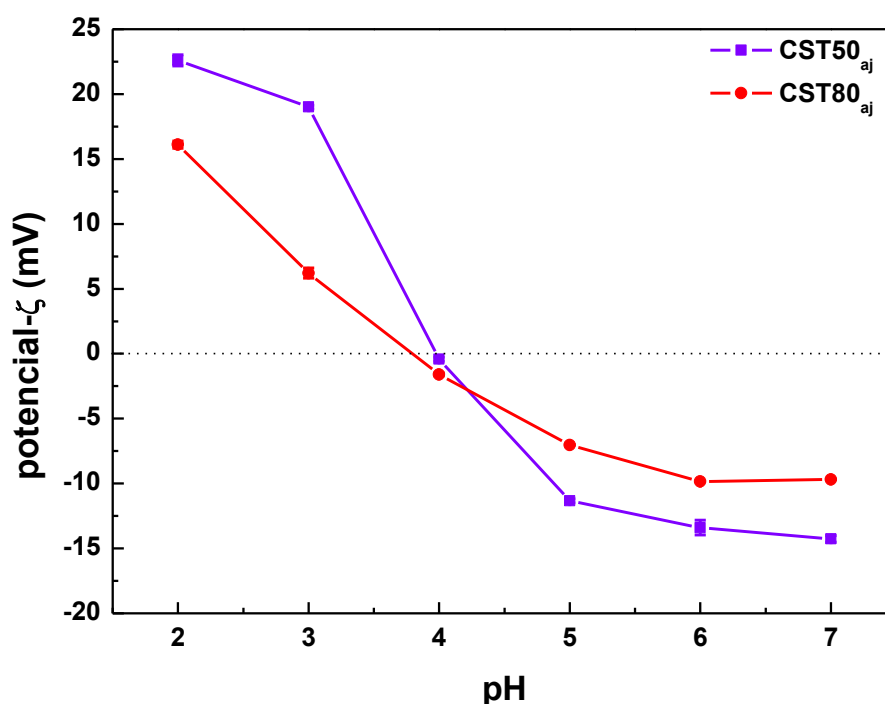


Figura 44: Dependencia del pH sobre el potencial-ζ de los concentrados de suero de tofu con ajuste previo de pH a la etapa de concentración bajo presión reducida a 50°C (CST50_{aj}), y 80 °C (CST80_{aj}).

Para CST80_{aj} la presencia de agregados estabilizados por puentes disulfuro se observaron por TSDS-PAGE (Figura 40), estos contribuirían a aumentar la resistencia contra el efecto disociador de la urea. En presencia de DTT, se observó una mayor reducción en los valores de turbidez para CST80_{aj} lo cual se atribuye a la disociación de los enlaces disulfuro que estabilizan los agregados proteicos de CST80_{aj} (Figuras 43b y 43c). Las tendencias descritas en esta sección también fueron observadas para las muestras CST50 y CST80 (sección 1.2.2.5), no obstante, los concentrados con pH ajustado tienen un menor estado de agregación, dado que durante el ajuste del pH incrementa el contenido de sodio proveniente del NaOH 1,0, el cual promovería una mayor pérdida de calcio durante la diálisis, reduciendo su

contenido en los concentrados con pH ajustado (Tabla 12). Por ende, el efecto hidrofóbico es menos intenso, durante los tratamientos hidrotermicos.

1.2.3.6. Dependencia de la solubilidad de proteínas e hidratos de carbono con el pH

La solubilidad proteica (S_P) y de hidratos de carbono (S_{HC}) de los concentrados de suero de tofu obtenidos a partir de STN se muestra en la Figura 45. Como se mencionó anteriormente, las interacciones proteína-proteína, proteína-polisacárido y de ambos biopolímeros con el calcio está menos favorecida en el STN. En este contexto, la S_P de ambos concentrados fue superior al 70% P/P en el rango de pH 2,0–7,0, mostrando los valores mínimos a pH 4,0 (Figuras 43a y 43b). La S_P de los concentrados obtenidos a partir del ST sin ajuste previo de pH (CST 50 y CST80, Figuras 36a y c) fue inferior a las de CST50_{aj} y CST80_{aj}, destacando el rol del calcio en la reducción de la S_P (Figuras 36a y c). Además, la solubilidad S_{HC} de ambos concentrados fue superior al 60% P/P en todo el rango de pH con un mínimo a pH 3,0. Como se explicó previamente, esto puede atribuirse a que los polisacáridos solubles del cotiledón y cáscara de soja presentes en el ST, exhiben una carga neta cero en el rango de pH 2,5–3,0 (Nakamura *et al.*, 2003; Porfiri y Wagner, 2018). CST80_{aj} exhibió una S_P menor a CST50_{aj}, observándose la tendencia opuesta en la S_{HC} (Figuras 45a y 45b). El tratamiento térmico del STN a mayor temperatura reduce la S_P debido a un aumento en la intensidad de efecto hidrofóbico, a las interacciones por enlaces disulfuro y a la glicosilación incipiente. Los agregados proteicos de alto peso molecular mediados por interacciones covalentes en CST80_{aj} se observaron claramente por TSDS-PAGE (Figura 40) y también se evidenció una disminución en el grado de flexibilidad estructural por FTIR debido a la agregación proteica (Figura 41). Al mismo tiempo, dado que los polisacáridos son moléculas más hidrofílicas, el aumento de la S_{HC} en CST80_{aj} se atribuiría a una exclusión de los polisacáridos durante el proceso de agregación proteica que tiene lugar durante la etapa de concentración. De hecho, la relación másica de polisacárido-proteína en la fracción solubles fue muy superior en CST80_{aj} en todo el rango de pH (Figura 45c).

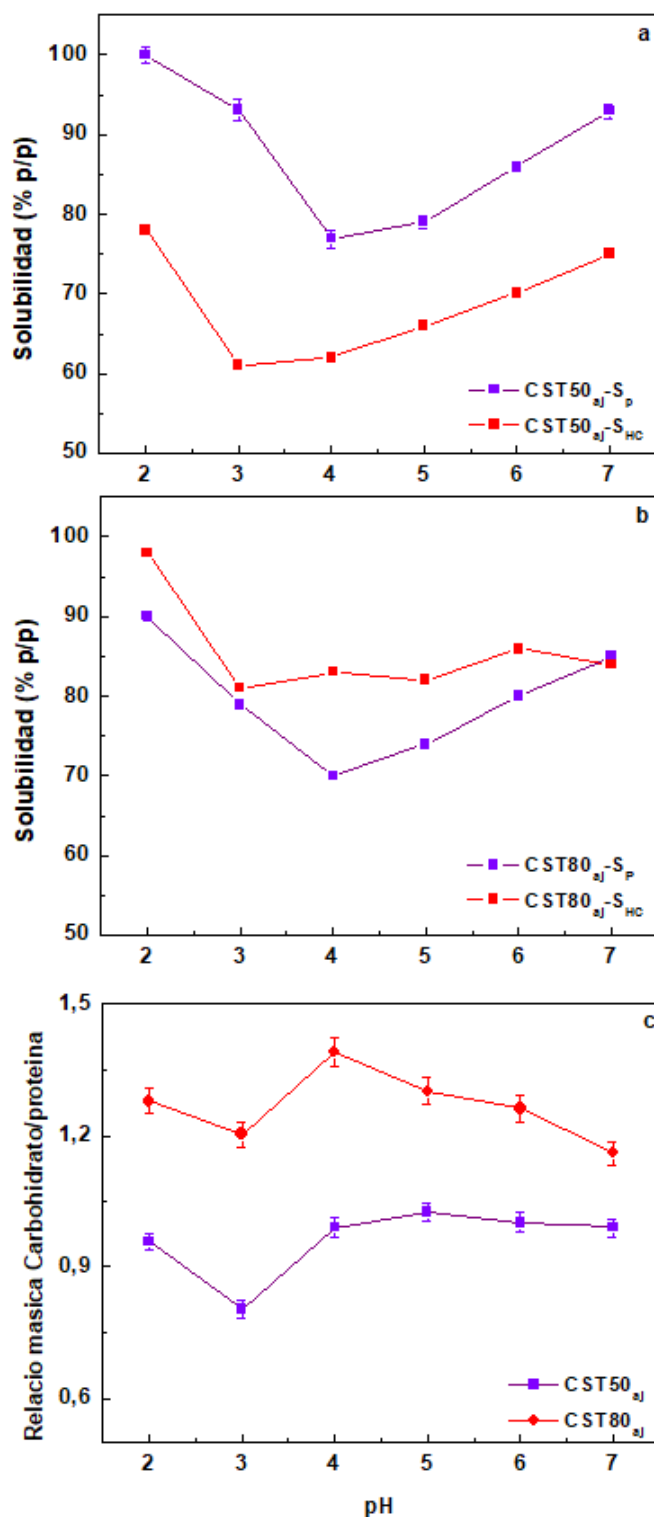


Figura 45: Efecto del pH sobre la solubilidad proteica (S_p) y de hidratos de carbono (S_{CH}) de los concentrados de suero de tofu obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu neutralizado a presión reducida: a) 50 °C (CST50_{aj}) y b) 80 °C (CST80); c) Efecto del pH sobre la relación másica carbohidratos/proteína en la fracción soluble de los concentrados CST50_{aj} y CST80_{aj}. La concentración de muestra en las dispersiones acuosas fue de 0,1% p/p. Los valores se expresaron como el promedio de tres determinaciones independientes (n=3) ± desvío estándar.

1.2.3.7. Evaluación del comportamiento superficial en interfase agua/aire

En esta sección se evaluó el comportamiento superficial en la interfase aire/agua de los concentrados obtenidos a partir del STN. Respecto a la presión superficial en equilibrio (π_s) la neutralización de ST previo al tratamiento térmico parece no afectar la actividad tensoactiva dado que los CST_{aj} exhibieron buena actividad superficial incrementando la π_s , con valores entre 27,40 a 30,54 mN/m (Tabla 14). Los valores máximos de presión superficial se obtuvieron a los pH 4,0 y 5,0 para ambos concentrados, estos resultados se atribuyen a la autoasociación máxima entre biopolímeros por la disminución de su carga (Figura 43). El efecto hidrofóbico se ve favorecido a pH cercano al punto isoeléctrico de las proteínas aumentando la adsorción en la interfase aire/agua, por lo tanto, aumentando la actividad superficial de los concentrados.

Tabla 14: Efecto del pH sobre la presión interfacial de equilibrio (π_s) de los concentrados de suero de tofu obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu neutralizado a presión reducida a 50 °C (CST50_{aj}) y 80 °C (CST80_{aj}).

pH	π_s (mN/m)	
	CST50 _{aj}	CST80 _{aj}
2,0	28,36 ± 0,05 ^{b,A}	30,27 ± 0,08 ^{c,B}
3,0	28,35 ± 0,09 ^{b,A}	30,00 ± 0,05 ^{b,B}
4,0	28,70 ± 0,20 ^{a,A}	30,54 ± 0,05 ^{d,B}
5,0	27,40 ± 0,20 ^{d,A}	30,50 ± 0,08 ^{d,B}
6,0	28,01 ± 0,10 ^{c,A}	29,22 ± 0,02 ^{a,B}
7,0	27,98 ± 0,08 ^{c,A}	29,00 ± 0,15 ^{a,B}

Los valores de presión superficial se expresaron como el promedio de tres determinaciones independientes ($n = 3$) ± desviación estándar. Los valores promedio en una misma columna seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher. Los valores promedio en una misma fila seguidos de letras mayúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según lo determinado por la prueba de Fisher.

Para CST50_{aj} la presión interfacial de equilibrio fue menor respecto a CST80_{aj} y a las muestras sin ajuste de pH (Tabla 10), asociado a que CST50_{aj} tiene menor agregación, lo cual reduce su capacidad para descender a tensión superficial. Sin embargo, los valores de π_s entre los concentrados obtenidos a 80°C (CST80_{aj} y CST80), no presentaron diferencias significativas (Tablas 10 y 14). La evolución de la viscosidad compleja (η^*) con el tiempo para CST50_{aj} y CST80_{aj} se muestra en la Figura 46. Para ambos concentrados, al cabo de 10 min, η^* logró estabilizarse en todo el rango de pH evaluado.

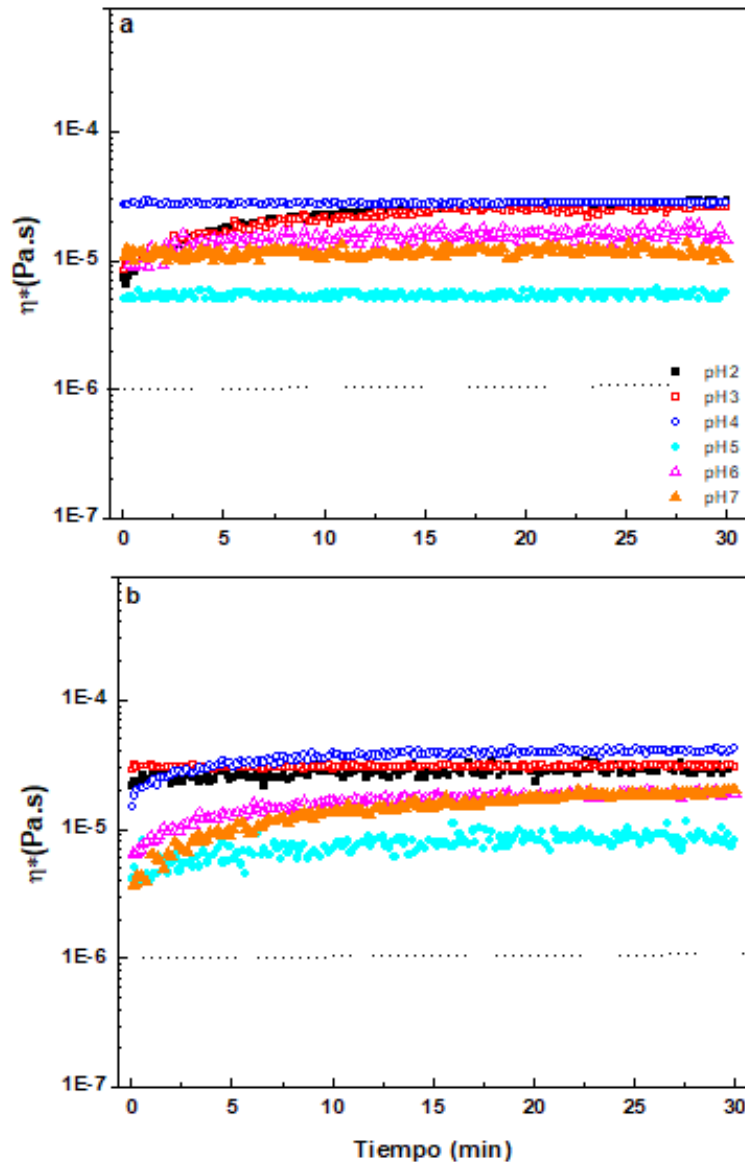


Figura 46: Perfiles interfaciales de viscosidad compleja (η^*) en función del tiempo, en la interfase aire/agua para los concentrados de suero de tofu a diferentes pH: a) CST50_{aj} y b) CST80_{aj}. Los ensayos se realizaron a una concentración equivalente de proteína (1,0 % p/p). Los valores se expresaron como el promedio de tres mediciones independientes ($n=3$) $\pm$ desvío estándar.

Para CST80_{aj} de pH 2,0 a 4,0, al cabo de 30 minutos, la viscosidad compleja fue ligeramente mayor respecto a CST50_{aj} (Figuras 46a y 46b). La relación de proteínas solubles/insolubles y la S_{HC} son fundamentales para comprender los procesos de adsorción interfacial de los biopolímeros, por su alta dependencia al pH. Dado que en CST80_{aj} tiene un alto contenido de partículas agregadas por el tratamiento térmico, disminuyendo su S_p (Figura 45b), se incrementó su capacidad de formar películas viscoelásticas conformada por los agregados adsorbidos; la misma tendencia se presentó en CST80 (Figura 38c). CST50_{aj} y CST50 exhibieron un comportamiento similar formando películas interfaciales con una η^* menor, por estar conformadas por proteínas con un menor estado de agregación (Figuras 34 y 43).

1.2.3.8. Evaluación de las propiedades espumantes

Un punto crucial en la formación de espumas es la rápida reducción de la tensión superficial del área creada por medio del tensoactivo. Las medidas de los parámetros espumantes para las muestras en estudio se presentan en la Figura 47. Ambos concentrados presentaron la capacidad de actuar como agente espumante por el método de burbujeo en todos los pH evaluados entre 2,0 y 7,0. Los valores de overrun entre ambos concentrados no exhiben diferencias significativas, exceptuando a pH 6,0 que fue mayor para CST50_{aj} (Figura 47a). A pH 4,0 se obtuvo el mayor overrun para ambos concentrados, obteniéndose valores de $1605 \pm 7,0$ y $1557 \pm 3,0$ para CST50_{aj} y CST80_{aj}, respectivamente (Figura 47). Estos resultados, se relaciona con la mayor actividad superficial de los biopolímeros a pH 4,0 (Tabla 14). Los valores de overrun ligeramente mayores de CST50_{aj}, se pueden asociar que de acuerdo con los ensayos de FTIR (Figura 41) y turbidez en agua (Figura 43a), el concentrado obtenidos a 50°C están constituidos por proteínas con menor estado de agregación y una mayor flexibilidad molecular, siendo estos parámetros vitales para la formación de espuma (Damodaran, 2006). Esta misma tendencia se observa en la muestra CST50 (Figura 39a) la cual exhibió un mayor overrun en todo el rango del pH, respecto a CST80.

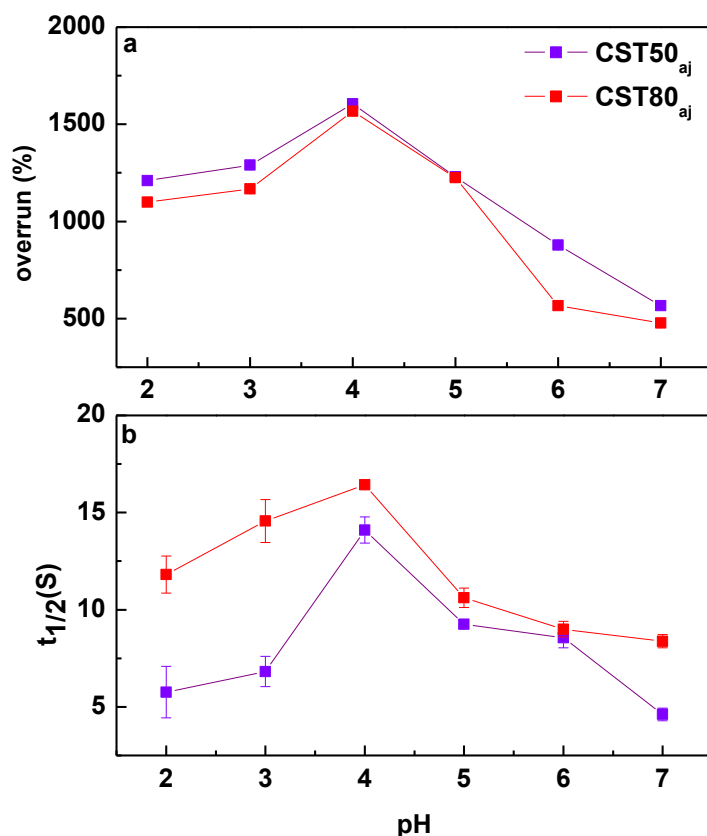


Figura 47: Efecto del pH sobre a) el Overrun (%) y b) el tiempo medio de colapso ($t_{1/2}$) de las espumas preparadas con dispersiones acuosas (1,0% proteína P/P) de concentrados de suero de tofu obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu neutralizado a presión reducida a 50°C (CST50_{aj}) y 80 °C (CST80_{aj}). Los parámetros se expresaron como el promedio de tres determinaciones independientes ($n=3$) $\pm$ desvío estándar.

La estabilidad de las espumas formadas fue mayor en todo el rango de pH evaluado (2,0 a 7,0) para la muestra CST80_{aj}, con un valor máximo de $t_{1/2}$ a pH 4,0 (Figura 47b). Como se ha mencionado reiteradamente, durante la etapa de concentración a 80°C en los concentrados con y sin ajuste de pH, se promueve la formación de agregados de carácter proteicos, que, durante la etapa de burbujeo en la formación de espumas, ingresan y se adsorben en la interfase aire/agua incrementando la viscoelasticidad de las películas interfacial, disminuyendo el proceso de desproporción y drenaje del líquido (Figura 47b). La S_{HC} fue mayor para los concentrados obtenidos a 80°C, respecto a los concentrados obtenidos a 50°C (Figuras 36 y 45), estos hidratos de carbono solubles, contribuyen en la estabilidad de las espumas, disminuyendo el drenaje de las espumas y el adelgazamiento de las películas interfaciales.

Para los concentrados con ajuste de pH previo, se evidenció una menor capacidad de formación de espuma y una disminución en la estabilidad frente al colapso, en comparación a

las muestras CST50 y CST80. Teniendo en cuenta los resultados de turbidez en agua (Figuras 34a,43a) y solubilidad (Figuras 36 y 45), los concentrados sin ajuste de pH son muestras con un mayor contenido de partículas agregadas formadas durante la etapa de concentración, por lo tanto, la presencia de estas cumple un papel clave en la estabilización de espumas otorgándole mayor estabilidad (Murray *et al.*, 2011). Además, esto se puede corroborar por lo ensayos de viscosidad compleja (Figura 46), donde los módulos de η^* para los concentrados neutralizados presentan una viscoelasticidad insuficiente para estabilizar las espumas frente al colapso por un tiempo prolongado.

1.2.4. Conclusiones parciales

- ✓ Los concentrados proteicos del suero de tofu exhibieron una composición química extraordinariamente compleja. Esta composición fue afectada tanto por el incremento de la temperatura en la etapa de concentración del suero de tofu como por la variación de pH del mismo previo a la concentración. El incremento de temperatura, independientemente del pH inicial del suero, promovió el enriquecimiento de los concentrados en proteína bruta, cenizas y calcio y la glicosilación incipiente de proteínas y de péptidos. El contenido de fibra dietaria total exhibió una variación menor en función de las variables de procesamiento mencionadas y se evidenció sólo un leve enriquecimiento con el aumento de la temperatura de obtención.
- ✓ Los concentrados evidenciaron, en términos generales, una composición polipeptídica similar. Independientemente del pH inicial del suero de tofu, el tratamiento térmico a 80°C promovió un mayor grado de agregación proteica por puentes disulfuro y por un incremento de la intensidad del efecto hidrofóbico. A la misma temperatura de obtención, el grado de agregación proteica fue sustancialmente mayor en los concentrados obtenidos a partir del suero de tofu sin ajuste previo de pH, destacando el rol clave de la presencia de calcio en este proceso. Al mismo tiempo, los polisacáridos incrementaron sustancialmente su solubilidad por incremento de la temperatura de obtención.
- ✓ Todos los concentrados evidenciaron un máximo grado de agregación en el rango de pH 4,0-4,5, acorde a valores de potencial- ζ cercanos a cero en dicho rango. La actividad superficial, evaluada por ensayos de tensiometría de anillo en interfase planar en la interfase agua/aire, fue mayor a valores de pH cercanos a 4,0. Este resultado muestra que

la disminución de la intensidad de la repulsión electrostática es fundamental para promover la adsorción de los biopolímeros en la interfase.

- ✓ Para las muestras obtenidas a 80°C hubo un incremento en la estabilidad de las espumas, relacionándose con la presencia de partículas de proteínas agregadas que ingresan en la interfase aire/agua e incrementan la viscoelasticidad de las películas interfaciales. Además, el mayor contenido de hidratos de carbono solubles en la fase acuosa, disminuyen el drenaje y colapso de las espumas. La neutralización de los concentrados de suero de tofu, afectó la estabilidad de las espumas, asociado a un menor contenido de calcio por la adición de sodio en la neutralización, reduciendo la formación de partículas agregadas que aportan rigidez y elasticidad a las películas interfaciales, que otorgan mayor estabilidad frente al drenaje y colapso de las espumas.

CAPÍTULO 2

***Propiedades emulsificantes de los
concentrados del suero de tofu y estabilidad de las
emulsiones o/w frente a tratamientos de estrés
tecnológico.***

2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1. Caracterización fisicoquímica de dispersiones de concentrado de suero de tofu

2.1.1.1. Distribución de tamaño de partícula por dispersión estática de luz (SLS, *Static Light Scattering*)

Por medio de esta técnica, también llamada de difracción láser, la distribución de tamaño (DTP) se obtiene a partir de la dependencia angular de la intensidad de luz dispersada por las partículas en una dispersión acuosa empleando la teoría de Mie (Castellani *et al.*, 2008). Para evitar los efectos de la dispersión múltiple de la luz las muestras son diluidas y continuamente agitadas para garantizar la homogeneidad de las muestras en el momento de la medición. En primer lugar, se prepararon dispersiones acuosas de los concentrados de suero de tofu (0,1% P/P) en agua destilada por agitación magnética suave durante 2 h. El pH de las dispersiones (500 mL) se ajustó a pH 3,0, 4,0 o 5,0 con HCl 1,0 M bajo agitación magnética constante. Las medidas se realizaron empleando un analizador Malvern Mastersizer modelo 2000–E (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido) asociado a una unidad de dispersión por vía húmeda (Hydro 2000 MU). La velocidad del émbolo agitador en la unidad dispersora fue de 1000 rpm y los parámetros ópticos seleccionados para la conversión del patrón angular de dispersión de luz en la correspondiente DTP fueron: índice de refracción del dispersante: 1,33, índice de refracción de la fase dispersa: 1,52 y coeficiente de absorción: 0,1. A partir de las DTP se obtuvieron los diámetros promedios de Sauter ($D_{3,2}$) y de De Brouckere ($D_{4,3}$):

$$D_{3,2} = \frac{\sum n_i \cdot d_i^3}{\sum n_i \cdot d_i^2} \quad (45)$$

$$D_{4,3} = \frac{\sum n_i \cdot d_i^4}{\sum n_i \cdot d_i^3} \quad (46)$$

En ambas expresiones, n_i es el número de partículas de diámetro d_i

2.1.1.2. Determinación de la tensión interfacial

La tensión interfacial en la interfase aceite/agua se midió a 25 °C usando un tensiómetro automatizado Lauda TD3 LMT 850 (Lauda Königshofen, Alemania). Las mediciones se realizaron empleando un anillo de Du Noüy, el cual fue convenientemente preparado para la eliminación de impurezas (sección 1.11.17.1) Se prepararon dispersiones acuosas en buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,0 (0,25 % de proteína % P/P) y el pH se ajustó a 3,0, 4,0 ó 5,0 con HCl 1,0 M. Para realizar las determinaciones, se colocaron 20 mL de dispersión acuosa en un cristizador, se sumergió el anillo de Du Noüy y luego se agregó cuidadosamente 20 mL de aceite refinado de girasol (Molino Cañuelas, Cañuelas, Argentina). La medición automatizada de la tensión interfacial y la optimización en el tiempo para la llegada al valor de equilibrio ($\gamma_{i,D}$) se detallaron en la sección 1.11.17.1. La presión interfacial (π_i) se calculó como:

$$\pi_i = \gamma_{i,A} - \gamma_{i,D} \quad (47)$$

$\gamma_{i,A}$ es la tensión interfacial del agua destilada, ajustada al mismo pH que el de la dispersión acuosa.

2.1.1.3. Evaluación de la reología interfacial

Las propiedades reológicas en la interfase aceite/agua se evaluaron en dispersiones acuosas (1,0% de proteína P/P) en el rango de pH 3,0 a 5,0. Se empleó un reómetro oscilatorio AR-G2 (TA Instruments, Waters LLC; Newcastle, DE, EE. UU.), al cual se asoció un anillo de Du Noüy (Figura 48). Para realizar los ensayos, las dispersiones acuosas (20 mL) se colocaron en un cristizador de vidrio de 6,7 cm de diámetro, se sumergió el anillo y posteriormente se colocó 20 mL de aceite refinado de girasol (Molino Cañuelas, Cañuelas, Argentina). Finalmente, el anillo se posicionó en la interfase agua/aceite, fijando un *gap* de 9000 μm en todas las mediciones para asegurar la reproducibilidad. Las medidas se realizaron con una frecuencia constante de 0,3 Hz y una deformación ajustada al 3,0% dentro del rango de viscoelasticidad lineal.

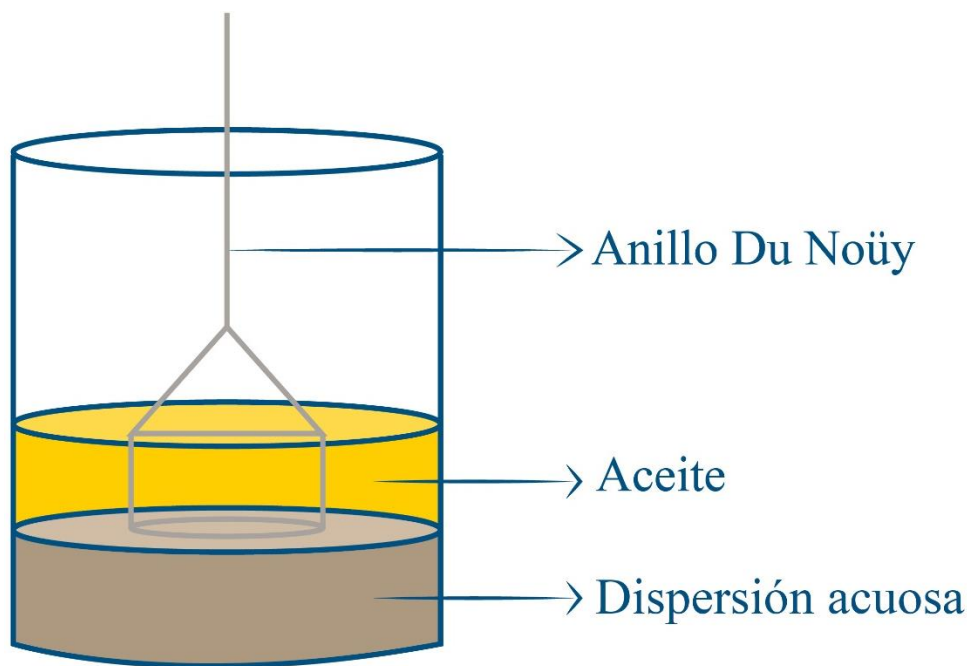


Figura 48: Representación esquemática de la geometría de anillo Du Noüy en la interfase aceite/agua para la determinación de la tensión interfacial de equilibrio y de la reología interfacial.

El seguimiento de las propiedades reológicas de las películas interfaciales se realizó mediante la variación de la viscosidad compleja interfacial en función del tiempo, la cual se calculó empleando la ecuación 43 (sección 1.11.17.2) (Baldursdottir *et al.*, 2010).

2.1.2. Preparación de emulsiones o/w

Las emulsiones se prepararon empleando un proceso de homogeneización de dos etapas consecutivas:

I) Homogeneización primaria: Se prepararon pre-emulsiones o emulsiones groseras por homogenización de 15 g de dispersiones acuosas (1,0% proteína P_P en buffer fosfato de sodio 10 mM, ajustadas a pH entre 3,0 a 5,0 con HCl 1,0 M) con 5 g de aceite refinado de girasol (Molino Cañuelas, Cañuelas, Argentina) en un recipiente de policloruro de vinilo (PVC) de 30 mm de diámetro interno. Se empleó un homogeneizador de alta velocidad rotor/estator Ultraturrax T-25 usando la punta de dispersión S25N-8G (IKA Labortechnik, Staufen, Alemania). La homogeneización se llevó a cabo durante un tiempo de 1 minuto a 20.000 rpm.

II) Homogeneización secundaria: Las emulsiones finales se obtuvieron por sonicación de las pre-emulsiones empleando un homogeneizador ultrasónico de alta intensidad Sonic Vibracell 750VCX (Sonic & Materials Inc.; Newtown, E.E.U.U.). La sonicación se llevó a cabo con un tiempo efectivo de 3 min (con secuencias *on/off* de 20 s), operando a 20 kHz y 40% de amplitud. Durante la homogeneización ultrasónica, el recipiente se introdujo en un baño de agua-hielo para permitir la disipación eficiente del calor generado durante la misma. Las emulsiones finales fueron inmediatamente caracterizadas y/o sometidas a los distintos tratamientos tecnológicos (secciones 2.1.3 y 2.1.4).

2.1.3. Tratamientos de estrés tecnológico sobre las emulsiones o/w

2.1.3.1. Congelación /descongelación

Las emulsiones recién preparadas (10 mL) se transfirieron a recipientes verticales de PVC con tapa plástica y 30 mm de diámetro interno y se almacenaron durante 24 h en un freezer convencional a -18 ± 2 °C. Finalmente, las emulsiones se descongelaron en un baño de agua a 30 ± 2 °C durante 1 h y fueron inmediatamente caracterizadas (sección 2.1.4).

2.1.3.2. Agitación mecánica controlada

Para llevar a cabo el tratamiento de agitación mecánica controlada, las emulsiones (20 mL) se transfirieron a recipientes verticales de PVC y 30 mm de diámetro interno. Luego, las emulsiones se colocaron en una cabina de agitación orbital (Ferca TT400; Ferca Equipamientos, Buenos Aires, Argentina). El tratamiento se realizó sometiendo las emulsiones a un esfuerzo de corte mecánico a 275 rpm durante 40 min, tomando alícuotas de 1 mL cada 10 min con el objetivo de monitorear la desestabilización de las emulsiones por medio de las técnicas de caracterización descriptas en la sección 2.1.4.

2.1.4. Ensayos de caracterización de emulsiones

2.1.4.1. Distribución de tamaño de partícula

La DTP de las emulsiones se determinó por dispersión estática de luz empleando un analizador de tamaño de partícula Malvern Mastersizer 2000-E (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido) asociado a una unidad de dispersión por vía húmeda (Hydro 2000 MU). Las medidas se realizaron usando agua como dispersante y la velocidad del émbolo agitador en la unidad dispersora fue de 2000 rpm. Para llevar a cabo las mediciones, las emulsiones iniciales o sometidas a distintos tratamientos (secciones 2.1.3.1 y 2.1.3.2) se diluyeron en el dispersante hasta alcanzar un nivel de turbidez adecuado. Los parámetros ópticos empleados para la conversión del patrón angular de dispersión de luz en la DTP fueron: índice de refracción del dispersante: 1,33, índice de refracción de la fase dispersa (aceite de girasol): 1,47 y coeficiente de absorción: 0,001. Para evaluar el grado de floculación de las emulsiones, no se utilizó el método tradicional de dilución previa con solución de SDS (Palazolo *et al.*, 2011); en su lugar, antes de realizar las medidas, las emulsiones diluidas en el dispersante se sometieron a una sonicación de baja energía (40 W, 1 min) empleando la punta ultrasónica asociada a la unidad de dispersión. Este procedimiento es más adecuado para romper los flóculos presentes en emulsiones preparadas con muestras ricas en polisacáridos (Higashitani *et al.*, 1993; Porfiri, Cabezas y Wagner, 2016). A partir de las DTP de las emulsiones sin y con tratamiento previo de sonicación, se obtuvieron los diámetros promedios de Sauter ($D_{3,2}$) y de De Brouckere ($D_{4,3}$). Finalmente, el grado de floculación (GF) se obtuvo a partir de la expresión:

$$GF = \left(\frac{D_{4,3 \text{ ns}} - D_{4,3 \text{ s}}}{D_{4,3 \text{ s}}} \right) \cdot 100 \quad (48)$$

$D_{4,3 \text{ ns}}$ y $D_{4,3 \text{ s}}$ son los valores de $D_{4,3}$ obtenidos a partir de las DTP de las emulsiones sin y con tratamiento de sonicación, respectivamente (Porfiri *et al.*, 2016)

2.1.4.2. Comportamiento de flujo

El comportamiento de flujo de las emulsiones iniciales se realizó empleando un reómetro AR-G2 (TA Instruments, Waters LLC; Newcastle, DE, EE. UU.) asociado a una geometría cono-plato (diámetro 40 mm y ángulo 2°; $gap = 1000 \mu\text{m}$). Los ensayos se realizaron a una velocidad de deformación entre 0,01 a 200 s^{-1} y a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, controlada mediante un

baño termostatzado (Julabo ACW100, Julabo Labortechnik; Seelbach, Alemania) adaptado al reómetro. Antes del inicio de los ensayos, todas las emulsiones se dejaron en reposo durante 2 min para equilibrar la temperatura. Las determinaciones se realizaron por triplicado y las curvas de flujo se ajustaron al modelo reológico de la Ley de Potencia:

$$\tau = K \cdot \gamma^n \quad (49)$$

γ es velocidad de deformación (s^{-1}) y los parámetros K ($Pa \cdot s$) y n (sin unidades) son los índices de consistencia y de comportamiento de flujo, respectivamente (Muller, 1973).

2.1.4.4. Evaluación de la microestructura

Para evaluar la microestructura de las emulsiones, se tomaron alícuotas de 10 μL de emulsión y posteriormente se diluyeron en proporción 1:10 (V/V) con agua destilada ajustada a pH 3,0, 4,0 o 5,0. Las emulsiones diluidas se colocaron en un portaobjetos (75 mm $\times$ 25 mm) y se cubrieron cuidadosamente con un cubreobjeto (22 mm $\times$ 22 mm). Las observaciones se realizaron empleando un lector multimodal de imagen Cytation 5 (BioTek Instruments, Inc.; Winooski, VT, EE. UU.), con un aumento de 100 $\times$ y 200 $\times$. Las imágenes se procesaron con software Gen 5 (R) asociado al equipo.

2.1.4.5. Determinación del porcentaje de proteína adsorbida y la concentración interfacial de proteína

Este ensayo se realizó en las emulsiones iniciales. Las emulsiones (15,0 mL) se colocaron en tubos cónicos graduados para centrífuga tipo Falcon de 15 mL de capacidad y se centrifugaron a 3000 $\times g$ durante 20 minutos a 4 °C empleando una centrifuga Sigma modelo 3-18KS (Sigma Laborzentrifugen GmbH; Osterode am Harz, Alemania) para acelerar la separación gravitacional sin romper el film interfacial que rodea las gotas. Seguidamente las emulsiones se congelaron durante 4 horas a -18 ± 2 °C. Los tubos congelados se cortaron garantizando que no exista contacto entre la fase crema y la fase acuosa. Ambas fases se descongelaron en vasos de precipitado durante 1 h a 20 °C. En la fase acuosa, la cual contiene las proteínas no adsorbidas, se tomaron alícuotas y se diluyeron con agua destilada (1:70 V/V). Al mismo tiempo, se realizaron diluciones (1:100 V/V) con agua destilada de las dispersiones acuosas, antes de la preparación de

las emulsiones. La concentración de proteína se determinó por el método de Markwell (Markwell *et al.*, 1978), siguiendo la metodología descrita en sección 1.1.16. El porcentaje de proteína adsorbida (P_A %) se calculó por la siguiente expresión:

$$P_A \% = \left[\frac{(P_D - P_S)}{P_S} \right] \cdot 100 = \left(\frac{\Delta P}{P_S} \right) \cdot 100 \quad (50)$$

P_D y P_S son las concentraciones de proteína en la dispersión y la fase acuosa, respectivamente (Puppo *et al.*, 2008). Por otro lado, la concentración interfacial de proteína (“protein load”, Γ , en mg/m²) se calculó por medio de la siguiente expresión (Li *et al.*, 2011):

$$\Gamma = \frac{\Delta P}{SSA} \quad (51)$$

SSA es el área superficial específica (m²/ml emulsión), obtenida por la expresión de Walstra (1983):

$$SSA = \frac{6 \cdot \phi}{D_{3,2s}} \quad (52)$$

ϕ es la fracción volumétrica de fase dispersa y $D_{3,2s}$ es el diámetro promedio de Sauter obtenido a partir de las DTP de las emulsiones con tratamiento de sonicación (sección 2.1.4.1). ϕ se calculó a partir de la fracción másica de fase dispersa ($\phi_m = 0,25$) por medio de la siguiente expresión (McClements, 2016).

$$\phi = \frac{\phi_m \cdot \rho_1}{\rho_1 \cdot \phi_m + (1 - \phi_m) \cdot \rho_2} \quad (53)$$

ρ_1 y ρ_2 son las densidades de las fases continua y dispersa, respectivamente, determinadas por picnometría.

2.1.5. Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado ($n = 3$) y los resultados se informaron como el promedio $\pm$ desvío estándar. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias entre las medias se evaluaron usando la prueba de Fisher (LSD) a un nivel de significancia del 5% ($p < 0.05$). El análisis estadístico se realizó con el software Statgraphics Centurion XV (Statpoint Technologies Inc.; Warrenton, VA, EE. UU.).

2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se evaluarán las propiedades emulsificantes de los concentrados del suero de tofu y la estabilidad de las emulsiones frente a tratamientos tecnológicos como la agitación mecánica y la congelación-descongelación. Como primer paso se va a realizar lo que se muestra en la sección 2.2.1 en el cual se realiza una caracterización de las dispersiones acuosas de los concentrados de suero de tofu y luego se evaluará (como trabajo principal) las propiedades emulsificantes de los concentrados del suero de tofu. En trabajos anteriores, se evaluaron las propiedades emulsificantes del suero de tofu deshidratado y de sus proteínas aisladas con tratamientos clásicos de purificación de proteínas, como la precipitación con solventes orgánicos (Sobral *et al.*, 2018). No obstante, estos estudios fueron llevados a cabo con dispersiones acuosas a pH 7,0 y la mayor parte de las matrices alimentarias en los alimentos emulsionados son ácidas debido a la formulación con acidulantes, por lo que es de mayor interés evaluar las propiedades emulsificantes de los concentrados del suero de tofu en medio ácido. En este trabajo, las propiedades emulsificantes se evaluaron a pH 3,0, 4,0 y 5,0.

2.2.1 Distribución de tamaño de partícula y comportamiento interfacial en la interfase agua/aceite de concentrados obtenidos a partir de suero de tofu sin ajuste de pH

2.2.1.1. Efecto del pH sobre la distribución de tamaño de partícula de las dispersiones acuosas

En la Figura 49 se observan las distribuciones de tamaño de partícula (DTP) de las dispersiones acuosas de los concentrados medidas por dispersión estática de luz (SLS, sección 2.1.1) y expresada como porcentaje en volumen y en superficie. A todos los valores de pH, las DTP exhibieron una población minoritaria de partículas con diámetros menores a 2 μm y otra mayoritaria en un rango amplio de diámetros (2–1000 μm), acorde con un alto grado de polidispersidad. El carácter bimodal se evidenció claramente en las dispersiones acuosas de CST65 y CST80, en tanto que para CST50 se observó una población principal con dos picos solapados, especialmente a pH 3,0 y 4,0 (Figura 49 a-c). A partir de las DTP en volumen, a cada valor de pH se puede observar que el tratamiento térmico a mayor temperatura promovió la formación de partículas de mayor tamaño, evidenciado no sólo por un desplazamiento de la moda de la población principal hacia mayores tamaños de partícula sino también con los

valores de los diámetros promedio de Sauter ($D_{3,2}$), de De Brouckere ($D_{4,3}$) y el percentil $D_{v0,9}$ siguiendo el orden creciente $CST50 < CST65 < CST80$ ($p < 0,05$, Tabla 15).

Cuando las DTP se expresaron en superficie, se observó una población principal de partículas de diámetros inferiores a $2 \mu m$, los cuales aparecieron solapados para todos los concentrados a cada valor de pH. Además, el 90% del área total, evaluada mediante el correspondiente percentil $D_{s0,9}$, se distribuyó en partículas menores a $40 \mu m$ (Figura 49 d-f; Tabla 16).

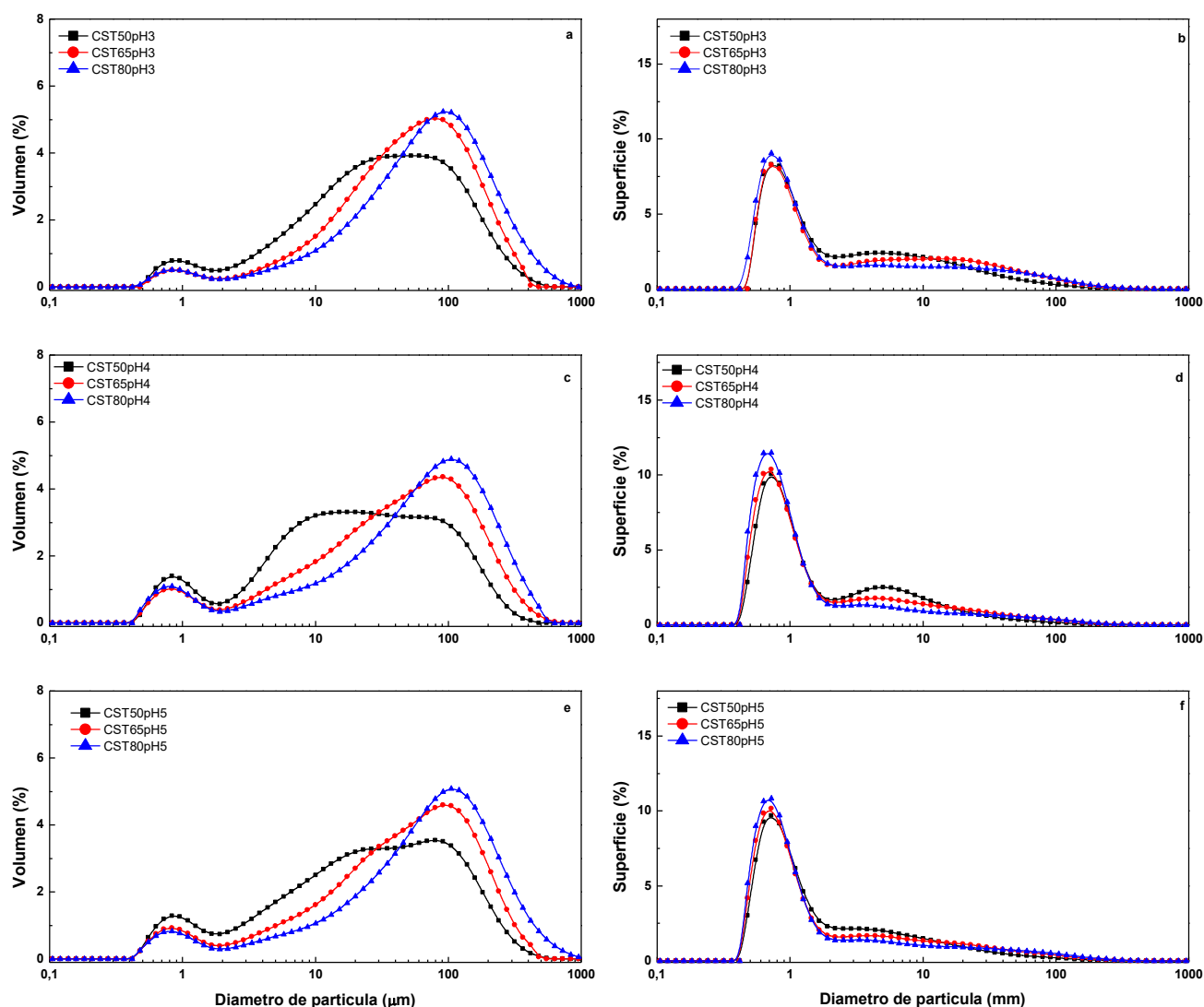


Figura 49: Distribución de tamaño de partícula de dispersiones acuosas de concentrados proteicos de suero de tofu obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu a presión reducida a $50^{\circ}C$ (CST50), $65^{\circ}C$ (CST65) y $80^{\circ}C$ (CST80). En volumen: a) pH 3,0, b) pH 4,0 y c) pH 5,0. En superficie: d) pH 3,0, e) pH 4,0 y f) pH 5,0. d

Tabla 15: Diámetros promedio de Sauter ($D_{3,2}$), de De Brouckere ($D_{4,3}$) y percentiles del 90% de la distribución tamaño de partícula en volumen ($D_{v0,9}$) y en superficie ($D_{s0,9}$) de las dispersiones acuosas de concentrados de suero de tofu obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu a presión reducida a 50 °C (CST50), 65 °C (CST65) y 80 °C (CST80).

Muestra	pH	$D_{3,2}$ (μm)	$D_{4,3}$ (μm)	$D_{v0,9}$ (μm)	$D_{s0,9}$ (μm)
CST50	3,0	$7,9 \pm 0,2^c$	$55,9 \pm 0,5^c$	$140,4 \pm 1,0^c$	$19,5 \pm 0,2^c$
	4,0	$5,1 \pm 0,1^a$	$41,3 \pm 0,3^a$	$112,2 \pm 0,7^a$	$11,3 \pm 0,1^a$
	5,0	$5,5 \pm 0,2^b$	$49,9 \pm 0,4^b$	$131,4 \pm 0,9^b$	$12,1 \pm 0,3^b$
CST65	3,0	$12,3 \pm 0,6^c$	$69,3 \pm 0,2^b$	$161,3 \pm 1,1^b$	$34,4 \pm 0,4^c$
	4,0	$7,1 \pm 0,2^a$	$66,8 \pm 0,6^a$	$159,3 \pm 0,8^a$	$16,1 \pm 0,2^a$
	5,0	$7,8 \pm 0,2^b$	$69,4 \pm 0,3^b$	$168,2 \pm 0,9^c$	$18,5 \pm 0,5^b$
CST80	3,0	$12,8 \pm 0,5^c$	$95,4 \pm 0,4^b$	$218,8 \pm 1,3^b$	$36,2 \pm 0,7^c$
	4,0	$7,2 \pm 0,4^a$	$86,3 \pm 0,2^a$	$207,3 \pm 1,1^a$	$14,2 \pm 0,3^a$
	5,0	$9,1 \pm 0,1^b$	$99,4 \pm 0,5^c$	$233,4 \pm 1,2^c$	$20,8 \pm 0,2^b$

Los valores de los diámetros promedios y los percentiles se expresaron como el promedio de tres determinaciones independientes ($n = 3$) $\pm$ desvío estándar. Los valores promedio en una misma columna seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes en un mismo CST ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher.

Como se mencionó en el capítulo anterior, todos los concentrados mostraron curvas de turbidez en agua destilada con valores máximos a pH 4,0, en tanto que el potencial- ζ fue cercano a 0 mV a este pH (Figuras 34a y 35). Además, de acuerdo con la variación de la solubilidad de proteínas (S_p) y de hidratos de carbono (S_{HC}) con el pH (Figura 36), el volumen absoluto (y, por ende, el área absoluta) de las partículas insolubles en las dispersiones acuosas es diferente a cada pH. En este contexto, para cada concentrado, la S_p es mínima a pH 4,0 (Figura 36) y debido a la auto-asociación se genera una nueva población de partículas insolubles de tamaño relativamente pequeño, que se tradujo en una disminución significativa de todos los parámetros ($D_{3,2}$, $D_{4,3}$, $D_{v0,9}$ y $D_{s0,9}$) respecto a los valores observados a pH 3,0 y 5,0 ($p < 0,05$, Tabla 16). Esta auto-asociación, promovida por una inhibición de la repulsión electrostática a pH 4,0 (Figura 35), fue especialmente evidente para CST50; en esta dispersión, la DTP en volumen mostró un mayor volumen relativo de partículas entre 2 y 10 μm y al mismo tiempo, una mayor contribución de las mismas al área total en la DTP en superficie

(Figuras 49 b y e). Para CST65 y CST80, con un mayor grado de agregación y una S_p significativamente inferior a la de CST50 (Figura 36), el efecto de la aparición de una nueva población insoluble de partículas a pH 4,0 fue difícil de distinguir en las DTP, pero se tradujo en una disminución significativa de todos los parámetros mencionados (Tabla 15). Es importante destacar que un efecto similar sobre la DTP asociado a la aparición de una nueva población de partículas insolubles por efecto de la adición de sales de calcio, fue observado previamente por Márquez *et al.* (2018) en emulsiones tipo crema preparadas con harina desgrasada de soja. A pH 3,0, donde el potencial- ζ de los concentrados tomó valores positivos (entre +12,0 y +17,0 mV, Figura 35), la contribución de las partículas insolubles formadas a pH 4,0 al volumen total (y área total) en la DPT es menor. En estas condiciones, en la DTP en superficie se observó una mayor proporción relativa del área total distribuida en partículas de mayor tamaño acorde a los valores significativamente más elevados del percentil $D_{s0,9}$ (Figura 49d y Tabla 15).

2.2.1.2. Comportamiento interfacial de los concentrados de suero de tofu en interfase agua/aceite

La Tabla 16 muestra la variación de la presión interfacial en equilibrio (π_i) con el pH para las dispersiones acuosas de CST50, CST65 y CST80. Todos los concentrados exhibieron una buena actividad interfacial en el rango de pH evaluado (3,0 a 5,0) con valores de π_i comprendidos entre $8,7 \pm 0,1$ y $10,0 \pm 0,1$ mN/m. Para cada concentrado, pH 4,0 y 5,0 se observaron valores similares de π_i ($p > 0,05$), en tanto que a pH 3,0 se evidenció una leve disminución de este parámetro ($p < 0,05$). Además, en términos generales, se observaron sólo leves diferencias en los valores de π_i para los distintos concentrados al mismo pH. Los ensayos de tensiometría se llevaron a cabo a concentración equivalente de proteína, condición en la que los tres concentrados mostraron una S_p marcadamente diferente en el rango de pH 3,0-5,0 (Figura 36). Por consiguiente, los valores de π_i no mostraron correlación con los de S_p y estarían también influenciados por la adsorción de partículas insolubles. Como se observó en la DTP en superficie, para todos los concentrados la mayor parte del área total está distribuida en partículas menores a 2 μm , independientemente del pH. No obstante, a pH 3,0, como se evidenció a través de los valores de $D_{s0,9}$, la contribución de partículas de mayor tamaño (en

especial entre 2 y 10 μm) al área total fue mayor (Figuras 49 d-f, Tabla 15). Este resultado, sumado a la contribución de la repulsión electrostática (Figura 35), podría explicar la leve disminución en la actividad interfacial de los tres concentrados a pH 3,0.

Tabla 16: Efecto del pH sobre presión interfacial de equilibrio (π_i) de los concentrados de suero de tofu obtenidos por tratamiento del suero de tofu a presión reducida a 50° (CST50), 65°C (CST65) y 80°C (CST80).

Presión interfacial (π_i , mN/m)			
pH	CST50	CST65	CST80
3,0	8,9 $\pm$ 0,2 ^{a,A}	8,7 $\pm$ 0,1 ^{a,A}	8,9 $\pm$ 0,1 ^{a,A}
4,0	9,6 $\pm$ 0,2 ^{b,A}	10,0 $\pm$ 0,1 ^{b,B}	9,7 $\pm$ 0,1 ^{b,A}
5,0	9,6 $\pm$ 0,3 ^{b,B}	9,8 $\pm$ 0,2 ^{b,B}	9,4 $\pm$ 0,2 ^{b,A}

Los valores de presión interfacial se expresaron como el promedio de tres determinaciones independientes ($n = 3$) $\pm$ desvío estándar. Los valores promedio en una misma columna seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher. Los valores promedio en una misma fila seguidos de letras mayúsculas diferentes son significativamente diferentes en un mismo CST ($p < 0,05$) según lo determinado por la prueba de Fisher.

Además, la adsorción interfacial de los concentrados en la interfase aceite/agua se monitoreó mediante la evolución de la viscosidad compleja interfacial (η^*) en función del tiempo. Los perfiles de adsorción se presentan en la Figura 51 evidenciándose una rápida difusión de todas las especies en la interfase aceite/agua al inicio del ensayo para todos los pH evaluados. Por consiguiente, se formaría una monocapa debido a la difusión y reordenamiento interfacial de las especies presentes en los concentrados (Baldursdottir y Jorgensen 2011).

Al final del ensayo, η^* llegó a valores máximos y cada concentrado mostró un comportamiento diferente en función del pH. Para CST50, los valores de η^* fueron similares a todos los pH (Figura 51a); en cambio, para los obtenidos por tratamiento térmico a mayor temperatura, se observaron los mayores valores de η^* a pH 3,0 (Figuras 51 b,c).

Como se mencionó anteriormente, a pH 3,0 la π_i de todos los concentrados fue similar ($p > 0,05$, Tabla 16). Dado que los valores de η^* son especialmente sensibles a las interacciones intermoleculares que se establecen entre los biopolímeros a nivel interfacial (Baldusdottir *et al.*, 2010), la mayor viscoelasticidad a pH 3,0 sería consistente con una mayor contribución de las partículas de mayor tamaño a la estructura del film interfacial. En este contexto, CST65 y

CST80 mostraron valores de $D_{s0,9}$ casi dos veces superiores al de CST50 (Tabla 15). Además, la naturaleza de los agregados también podría ejercer un rol importante en el comportamiento reológico de la interfase. CST65 y CST80 tienen una S_P más baja y al mismo tiempo una S_{HC} más elevada que la de CST50, resultado acorde con la presencia de una fracción de partículas insolubles más ricas en proteínas y con menor asociación a polisacáridos (Figuras 36 y 37). Las interacciones más intensas entre moléculas de proteína de las partículas adsorbidas favorecerían el incremento de η^* .

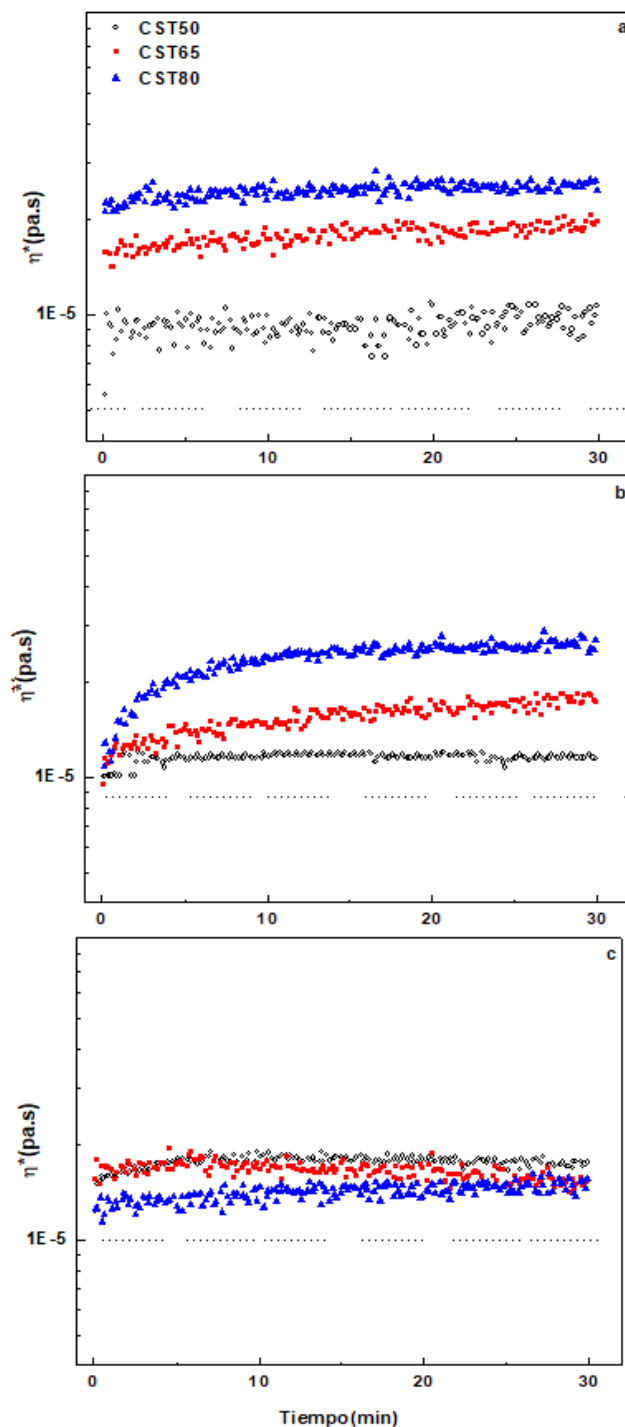


Figura 50: Perfiles interfaciales de viscosidad compleja (η^*) en función del tiempo, en la interfase aceite/agua para los concentrados de suero de tofu obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu a presión reducida a 50 °C (CST50), 65 °C (CST65) y 80 °C (CST80): a) pH 3,0, b) pH 4,0 y c) pH 5,0. Los ensayos fueron realizados a una concentración de proteína equivalente en las dispersiones (1,0 % P/P). Los valores fueron expresados como el promedio de tres mediciones independientes ($n=3$) $\pm$ desvío estándar.

2.2.2. Caracterización de emulsiones iniciales

2.2.2.1. Distribución de tamaño de partícula y microestructura

En esta sección se evaluarán la distribución de tamaño de partícula y la microestructura de las emulsiones iniciales, sin aplicación de tratamientos tecnológicos. La Figura 51 muestra la distribución de tamaño de partícula en volumen para las emulsiones iniciales sin y con sonicación, elaboradas con dispersiones acuosas de CST50 ajustadas a pH 3,0, 4,0 y 5,0. Independientemente del tratamiento de sonicación, a pH 3,0 y 4,0 las emulsiones mostraron una DTP monomodal; en cambio, a pH 5,0 se observó una DTP de carácter bimodal, con una población principal de partículas de diámetros mayores a 2,0 μm . Con el incremento del pH (3,0 a 5,0), se observó un desplazamiento de la moda de la población principal hacia mayores diámetros de partícula. Este resultado fue consistente con un aumento significativo de los diámetros promedio de Sauter ($D_{3,2}$) y de Brouckere ($D_{4,3}$) con el aumento de pH ($p < 0,05$, Tabla 16). Además, al realizar el tratamiento de sonicación previo a la medición, las DTP evidenciaron un desplazamiento de las modas hacia menores tamaños de partícula. Este resultado se atribuyó a la ruptura de flóculos debido a la sonicación de baja energía (Porfiri *et al.*, 2016). De hecho, la presencia de flóculos se observó por microscopía óptica, donde también se evidenció en forma cualitativa la presencia de gotas de mayor tamaño en la emulsión CST50 a pH 5,0, en concordancia con los valores más elevados de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ (Tabla 16).

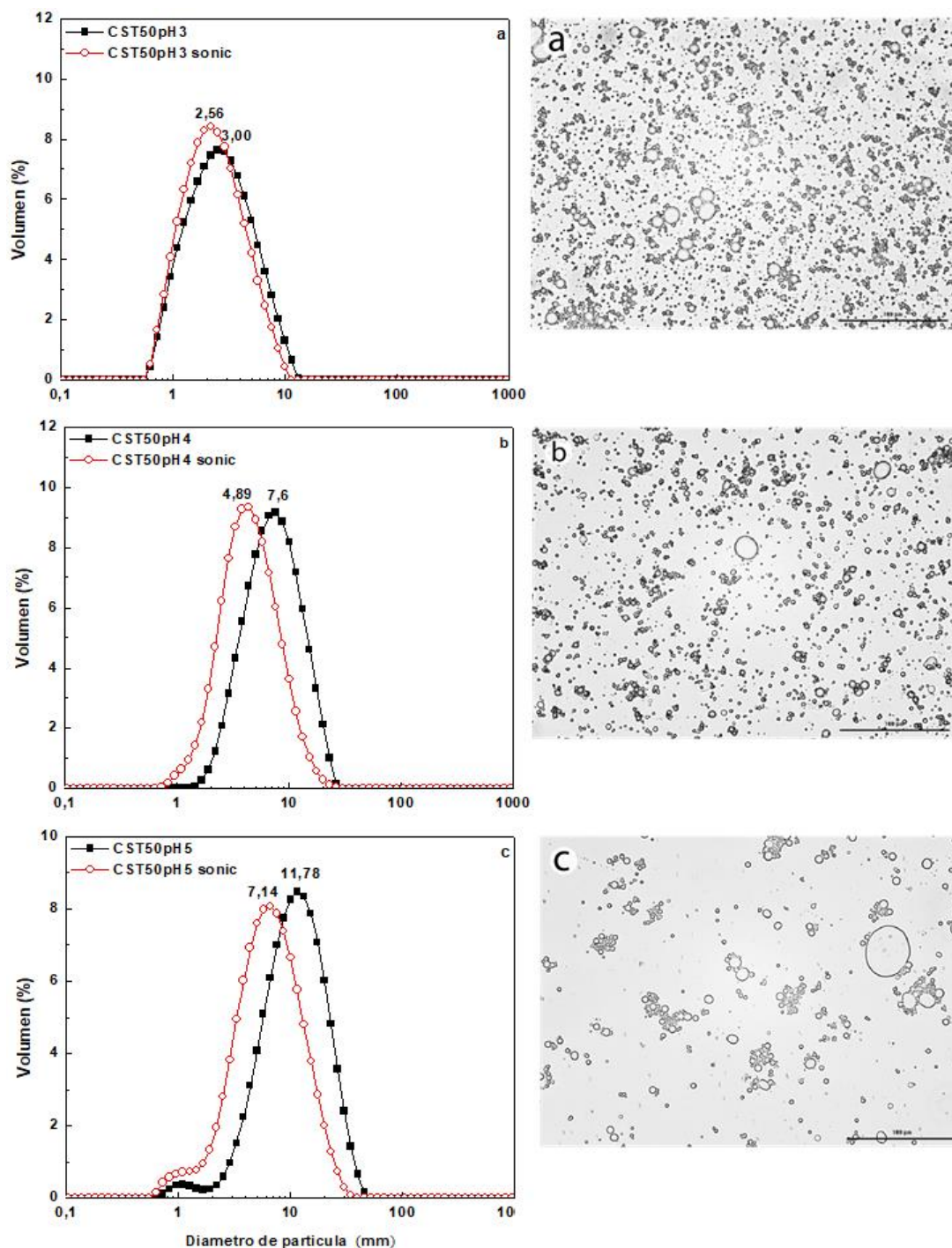


Figura 51: Distribuciones de tamaño de partícula medidas con y sin sonicación y microestructura de emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas (1,0% proteína P/P) de CST50: a) pH 3,0, b) pH 4,0 c) pH 5,0. Para el análisis de la microestructura (aumento: 200×), las emulsiones se diluyeron 1:20 V/V con agua destilada ajustada al mismo pH de las emulsiones. Barra: 100 μm.

El grado de floculación (GF), calculado a partir de los valores de $D_{4,3}$ sin y con sonicación, mostró el valor más bajo a pH 3,0 (Tabla 16, $p < 0,05$). Para el cálculo del GF se midió la DTP con un tratamiento previo de sonicación, en lugar de emplear el procedimiento clásico por dilución con el agente surfactante SDS. En emulsiones preparadas con proteínas como únicos agentes emulsificantes, el SDS, a relaciones adecuadas surfactante-proteína, desplaza completamente a las proteínas de la interfase permitiendo la disociación total de los flóculos, aún aquellos formados por un mecanismo irreversible de puenteo (*bridging flocculation*) (Palazolo *et al.*, 2011; Puppo *et al.*, 2008).

Tabla 17: Diámetros promedios de Sauter ($D_{3,2}$) y De Brouckere ($D_{4,3}$) obtenidos a partir de las distribuciones de tamaño de partícula de emulsiones O/W medidas sin sonicación previa y preparadas con dispersiones acuosas de CST50, CST65 y CST80 (1,0 % P/P de proteína, pH 3,0, 4,0 y 5,0). El grado de floculación (GF) se obtuvo a partir de los valores de $D_{4,3}$ sin y con sonicación (ecuación 52).

CST50							
pH	3,0	4,0	5,0	pH	3,0	4,0	5,0
$D_{4,3}$ (μm)	$3,0 \pm 0,1$ b,A	$7,6 \pm 0,3$ c,B	$11,8 \pm 0,1$ c,C	$D_{3,2}$ (μm)	$2,0 \pm 0,3$ a,A	$5,6 \pm 0,7$ a, B	$6,7 \pm 0,4$ a,B
GF (%)	$17,1 \pm 1,2$ b,A	$56,1 \pm 5,4$ c,B	$65,0 \pm 1,4$ c,C				
CST65							
pH	3,0	4,0	5,0	pH	3,0	4,0	5,0
$D_{4,3}$ (μm)	$2,6 \pm 0,5$ a,A	$5,2 \pm 0,2$ b,B	$7,7 \pm 0,1$ a,C	$D_{3,2}$ (μm)	$1,9 \pm 0,1$ a,A	$4,0 \pm 0,2$ a,B	$5,7 \pm 0,2$ a,C
GF (%)	$18,4 \pm 2,2$ b, A	$26,1 \pm 5,0$ a, B	$36,0 \pm 2,1$ a,C				
CST80							
pH	3,0	4,0	5,0	pH	3,0	4,0	5,0
$D_{4,3}$ (μm)	$2,4 \pm 0,1$ a,A	$4,6 \pm 0,1$ a,B	$9,0 \pm 0,2$ b, C	$D_{3,2}$ (μm)	$1,7 \pm 0,1$ a, A	$5,1 \pm 0,1$ a, B	$6,5 \pm 0,1$ a,C
GF (%)	$7,5 \pm 1,0$ a, A	$43,4 \pm 0,6$ b, B	$62,5 \pm 2,1$ b, C				

Los valores se expresaron como el promedio a de tres mediciones independientes ($n = 3$) $\pm$ desvío estándar. Los valores promedio en una misma columna (emulsiones preparadas con distintos concentrados al mismo pH) seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher. Los valores promedio en una misma fila (emulsiones preparadas con el mismo concentrado a distintos pH) seguidos de letras mayúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según lo determinado por la prueba de Fisher.

No obstante, en emulsiones preparadas con muestras de composición más compleja y/o en presencia de polisacáridos, el tratamiento con SDS tiene menor efectividad e incluso, puede

promover la coalescencia de las gotas que conforman los flóculos, impidiendo la evaluación del grado de floculación. En este trabajo, en ensayos preliminares, los valores de $D_{4,3}$ de las emulsiones obtenidos en presencia de SDS fueron mayores a los obtenidos sin el surfactante (resultados no mostrados). Por ende, se seleccionó el tratamiento de sonicación previo, que permite una mejor evaluación del GF en emulsiones preparadas con muestras ricas en polisacáridos (Porfiri *et al.*, 2016). En este contexto, se debe considerar que los valores obtenidos de GF son *aparentes* y deberían tomarse con cierta precaución: *i)* como se puede observar en los ensayos de microscopía óptica (Figura 51), los flóculos tienen forma irregular y el analizador por SLS mide el diámetro de la esfera de un volumen equivalente al de las partículas (Rawle, 2005); *ii)* en las condiciones de alta dilución y agitación en la unidad de dispersión, sólo los flóculos estables formados por un mecanismo de puenteo son efectivamente medidos (Thanasukarn *et al.*, 2004) y *iii)* el valor de GF depende del tiempo y la intensidad del tratamiento de sonicación. A pesar de estas limitaciones, la estrategia para evaluar el GF por tratamiento previo con SDS o sonicación, ha sido empleada en varios trabajos previos (Puppo *et al.*, 2008; Palazolo *et al.*, 2011; Porfiri *et al.*, 2016; Porfiri *et al.*, 2017; Colletti *et al.*, 2019).

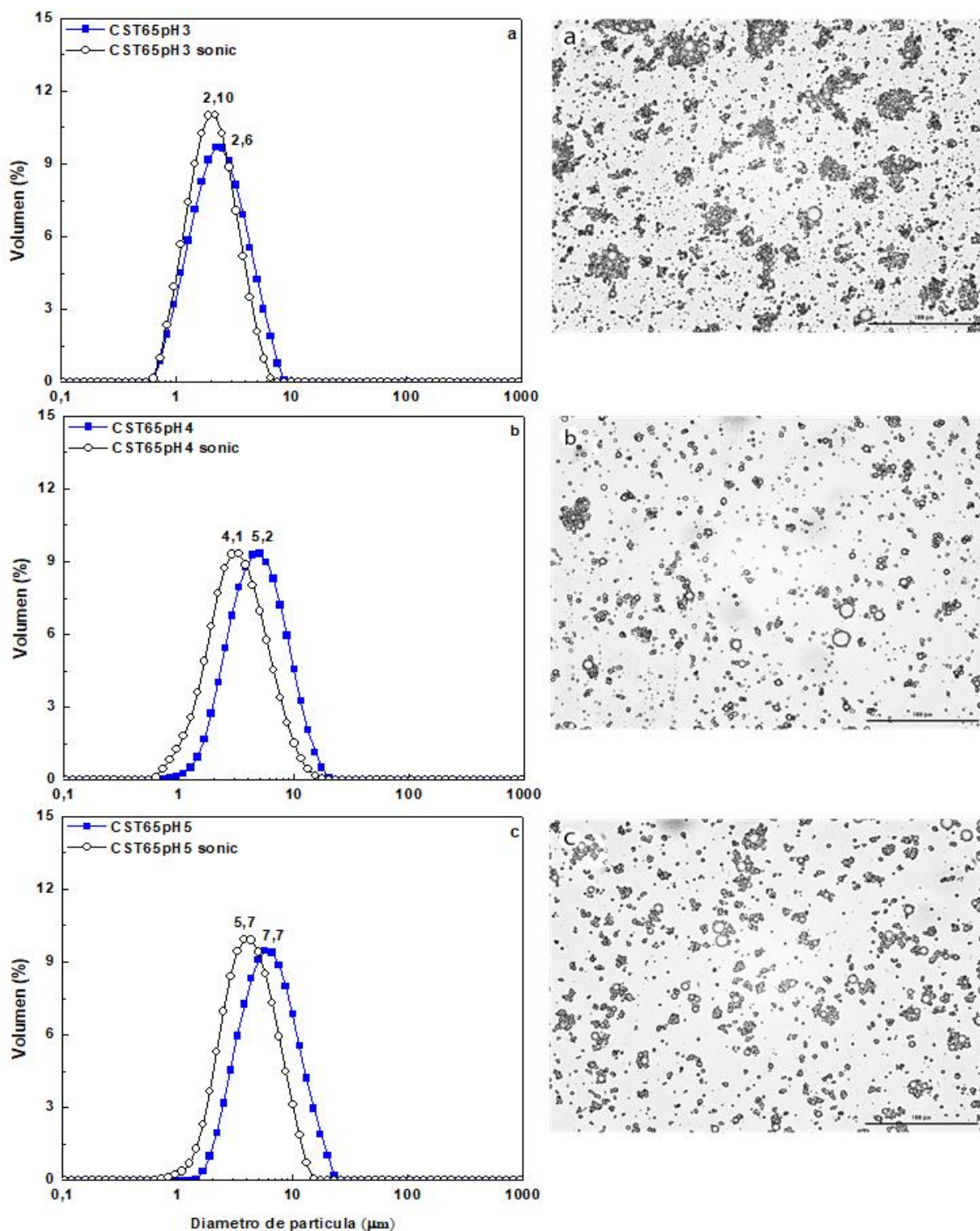


Figura 52: Distribuciones de tamaño de partícula medidas con y sin sonicación y microestructura de emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas (1,0% proteína P/P) de CST65: a) pH 3,0, b) pH 4,0 c) pH 5,0. Para el análisis de la microestructura (aumento: 200×), las emulsiones se diluyeron 1:20 V/V con agua destilada ajustada al mismo pH de las emulsiones. Barra: 100 μm.

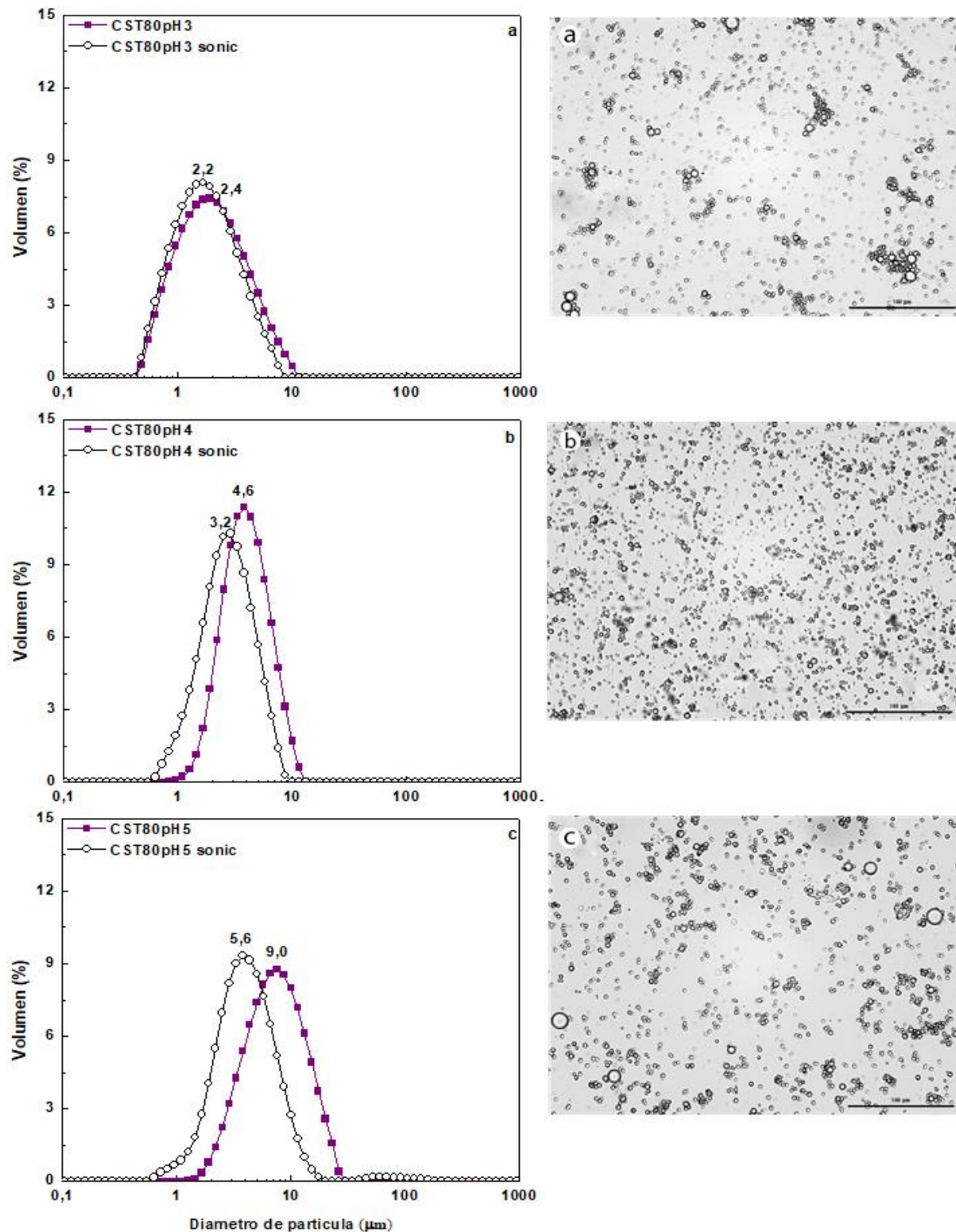


Figura 53: Distribuciones de tamaño de partícula medidas con y sin sonicación y microestructura de emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas (1,0% proteína P/P) de CST80: a) pH 3,0, b) pH 4,0 c) pH 5,0. Para el análisis de la microestructura (aumento: 200×), las emulsiones se diluyeron 1:20 V/V con agua destilada ajustada al mismo pH de las emulsiones. Barra: 100 μm.

Las DTP de las emulsiones CST65 y CST80 mostraron a todos los valores de pH, un carácter monomodal (Figuras 52 y 53). Al igual que en las preparadas con CST50, el incremento de pH promovió el desplazamiento de las modas de las DTP hacia menores diámetros de partícula, acorde a una disminución de los valores de $D_{4,3}$ y $D_{3,2}$. Además, en las emulsiones CST65 y CST80 se observó la presencia de flóculos, con un GF mínimo a pH 3,0 (Tabla 16).

Un análisis comparativo entre la DTP de las emulsiones de los distintos concentrados al mismo pH reveló que las preparadas con CST80 y CST65 mostraron, en general, valores de $D_{4,3}$ y $D_{3,2}$ inferiores a los de las CST50; estos resultados reflejan un mejor comportamiento como emulsificante de los concentrados obtenidos por tratamiento térmico a mayor temperatura. De acuerdo con Jafari *et al.* (2008), el tamaño de las gotas evaluado a través de la DTP y los parámetros asociados ($D_{3,2}$, $D_{4,3}$) es un balance entre los procesos de ruptura y re-coalescencia durante la homogeneización. Además, en emulsiones preparadas con biopolímeros, se puede promover la floculación por puenteo cuando no hay cantidad suficiente de emulsificante para cubrir el área interfacial creada o cuando la adsorción del emulsificante es lenta en relación con la velocidad de creación del área interfacial (McClements, 2016). El mejor comportamiento como emulsificante de los concentrados a pH 3,0 no está asociado a una mayor actividad interfacial, dado que la π_i fue significativamente menor a las observadas a pH 4,0 y 5,0 ($p < 0,05$, Tabla 16). Además, las condiciones de adsorción interfacial durante la homogeneización son diferentes a la de los ensayos de evaluación del comportamiento interfacial; durante la homogeneización, la adsorción interfacial es forzada por el flujo turbulento y la cavitación. En estas condiciones, la presencia de agregados de mayor tamaño en los concentrados a pH 3,0 favorecería su rápida adsorción interfacial y minimizaría la re-coalescencia y la floculación por puenteo, dando emulsiones de menor tamaño de partícula y GF respecto a la preparadas a pH 4,0 y 5,0.

2.2.2.2. Porcentaje de proteína adsorbida y concentración de proteína interfacial

El porcentaje de proteína adsorbida (% P_A) y la concentración de proteína interfacial (Γ , “protein load”) de las emulsiones preparadas con los concentrados proteicos de suero de tofu se muestran en la Tabla 18. Para un mismo concentrado se observa que los mayores % P_A se evidenciaron a pH 3,0. Además, al comparar este parámetro entre distintos concentrados al mismo pH, se observó el orden creciente CST50<CST65<CST80 ($p<0,05$). El % P_A es un

parámetro no sólo influenciado por la adsorción de proteínas solubles sino también por la adsorción de partículas insolubles. En el rango de pH 3,0-5,0, la S_p de los concentrados exhibió claramente el orden creciente $CST80 < CST65 < CST50$ (Figura 36), pero el $\%P_A$ mostró los mayores valores para CST80 en el rango de pH mencionado. Por consiguiente, en la adsorción interfacial participarían agregados insolubles, que serían eficientemente adsorbidos en las condiciones de homogeneización. A pH 3,0, la contribución de las partículas de mayor tamaño en las dispersiones acuosas, evaluada a través del $D_{s0,9}$ (Tabla 15) promovería un incremento del $\%P_A$ luego de la homogeneización. Esta contribución es especialmente evidente en las emulsiones CST65 y CST80, cuyas dispersiones acuosas mostraron también los valores más elevados de η^* en los ensayos de reología interfacial.

Por otro lado, para las emulsiones preparadas con todos los concentrados, los valores de Γ fueron significativamente superiores a pH 3,0 ($p < 0,05$, Tabla 18). Estos resultados estarían directamente relacionados a los menores valores promedios de $D_{3,2}$ al pH mencionado dado que existe una relación entre el Γ y el aumento del área interfacial (Puppo *et al.*, 2005).

Tabla 18: Porcentaje de proteína adsorbida ($\% P_A$) y concentración de proteína interfacial (Γ) de las emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas (1,0% proteína P/P , pH 3,0, 4,0 y 5,0) de concentrados de suero de tofu obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu a presión reducida a 50 °C (CST50), 65 °C (CST65) y 80 °C (CST80).

Muestra	pH	Proteína adsorbida ($\%P_A$)	Concentración de proteína interfacial (Γ , mg/m ²)
CST50	3,0	39,50±0,10 ^c	3,06±0,19 ^c
	4,0	37,40±0,21 ^b	1,50±0,10 ^b
	5,0	35,80±0,24 ^a	1,23±0,10 ^a
CST65	3,0	47,00±0,51 ^c	3,96±0,21 ^c
	4,0	43,20±0,31 ^b	2,44±0,10 ^b
	5,0	40,70±0,35 ^a	1,43±0,08 ^a
CST80	3,0	50,10±0,50 ^c	4,10±0,20 ^c
	4,0	46,40±0,39 ^b	2,59±0,15 ^b
	5,0	41,10±0,21 ^a	1,71±0,09 ^a

Los valores de $\%P_A$ y Γ se expresaron como el promedio de tres determinaciones independientes ($n = 3$) $\pm$ desvío estándar. Los valores promedio en una misma columna seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes en un mismo CST ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher.

2.2.2.3 Comportamiento de flujo de las emulsiones

La Figura 54 muestra la variación de la viscosidad aparente con la velocidad de deformación para las emulsiones preparadas con los concentrados CST50, CST65 y CST80 a los distintos pH. Los resultados obtenidos fueron consistentes con un comportamiento de carácter pseudoplástico de las emulsiones. De acuerdo con las micrografías (Figuras 51, 52 y 53), todas las emulsiones mostraron la presencia de flóculos por lo que la caída pronunciada de la viscosidad a bajas velocidades de corte se atribuiría a la ruptura o disociación de los flóculos en las condiciones del ensayo (Dickinson 1994; McClements 2016; Tadros 2004).

A las curvas de flujo obtenidas se les aplicó el modelo reológico de la ley de potencia (ecuación 53), con coeficientes de correlación (R^2) muy cercanos a 1,0, donde K es el índice de consistencia y n es el índice de comportamiento de flujo; este modelo fue adecuado para este tipo de emulsiones. Cuando $n=1$ las emulsiones exhiben un comportamiento newtoniano y si n es inferior a 1 muestran un comportamiento pseudoplástico (Tadros 2004). En la Tabla 19 se puede observar que los valores de K se incrementaron significativamente con el aumento de pH (3,0 a 5,0) y al mismo tiempo se observó una disminución de los valores de n ($p < 0,05$). Además, al mismo pH, los valores de K de las emulsiones CST50 fueron superiores al de las emulsiones preparadas con los demás concentrados ($p < 0,05$).

Tabla 19: Constantes reológicas del modelo de ley de potencia (K: índice de consistencia y n: índice de comportamiento de flujo) para las emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas (1,0% P/P de proteína, pH 3,0, 4,0 y 5,0) de concentrados de suero de tofu obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu a presión reducida a 50°C (CST50), 65°C (CST65) y 80°C (CST80).

CST50			
pH	3,0	4,0	5,0
K	0,10±0,05 ^{a,A}	0,13±0,09 ^{b,A}	0,29±0,08 ^{cA}
n	0,90±0,01 ^{a,A}	0,85±0,03 ^{bA}	0,71±0,09 ^{c,A}
CST65			
pH	3,0	4,0	5,0
K	0,05±0,01 ^{a,B}	0,07±0,03 ^{a,B}	0,13±0,06 ^{b,B}
n	0,90±0,02 ^{a,B}	0,60±0,06 ^{b,B}	0,55±0,04 ^{c,B}
CST80			
pH	3,0	4,0	5,0
K	0,03±0,01 ^{a,A}	0,08±0,05 ^{b,B}	0,12±0,08 ^{c,B}
n	0,91±0,03 ^{a,A}	0,66±0,06 ^{b,C}	0,51±0,06 ^{c,C}

Los valores se expresaron como el promedio de tres mediciones independientes ($n = 3$) $\pm$ desvío estándar. Los valores promedio en una misma columna seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher. Los valores promedio en una misma fila seguidos de letras mayúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según lo determinado por la prueba de Fisher.

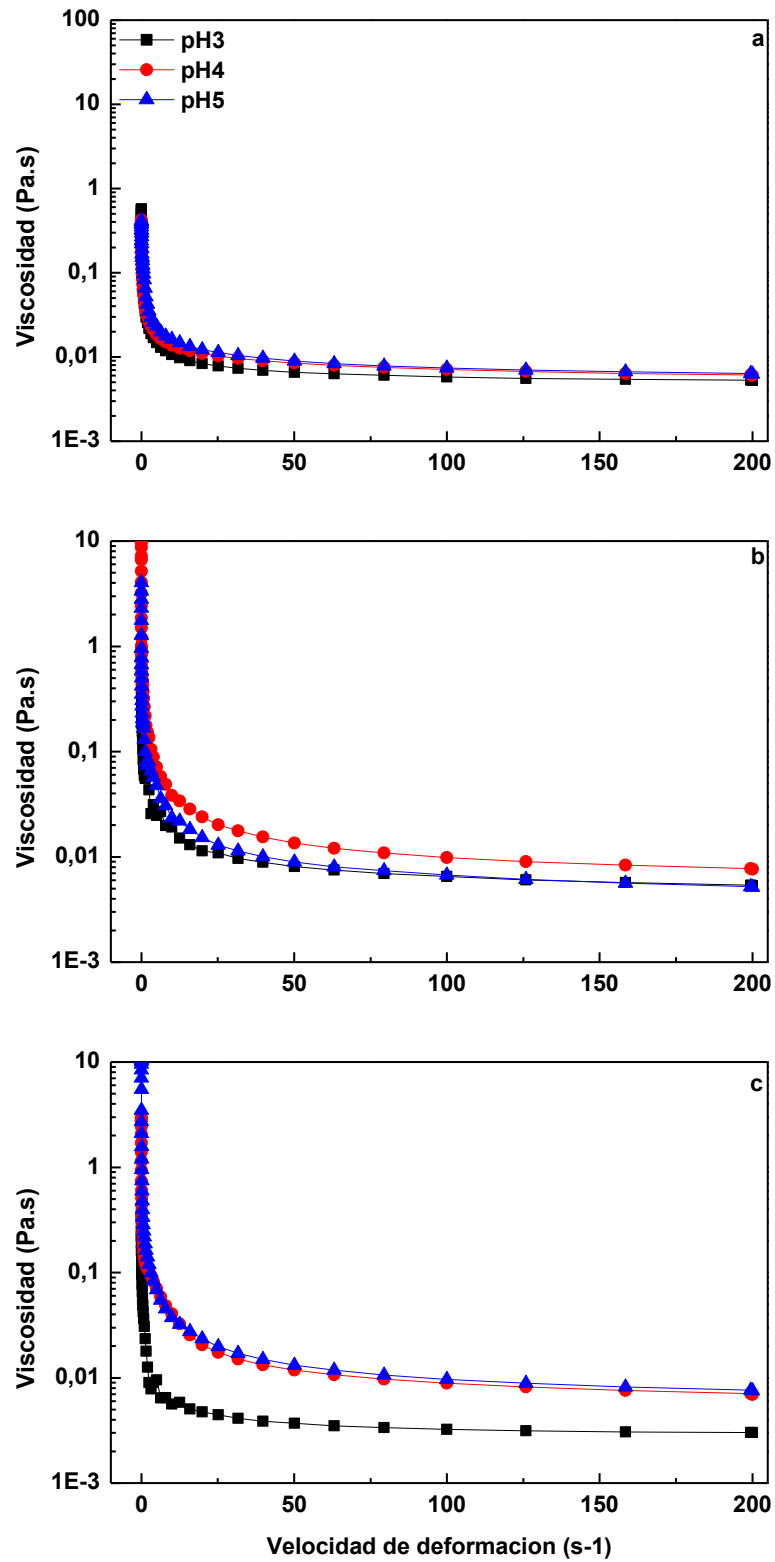


Figura 54: Comportamiento de flujo de emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas de concentrados de suero de tofu (1,0% P/P de proteína, pH 3,0, 4,0 y 5,0): a) CST50, b) CST65 y c) CST80.

El aumento del índice de consistencia y en especial, la disminución de n (mayor pseudoplasticidad) estaría asociada a un incremento en el GF de las emulsiones (Tabla 17), que fue especialmente evidente al comparar el comportamiento de flujo de las emulsiones a pH 5,0 con respecto a las de pH 3,0 y 4,0 para todos los concentrados.

2.2.3. Evaluación de la estabilidad de las emulsiones frente a los tratamientos tecnológicos

2.2.3.1 Congelación-descongelación

En esta sección se evaluará la estabilidad de las emulsiones frente a la congelación-descongelación. Como se mencionó en la introducción de este trabajo, este tratamiento tecnológico es altamente desestabilizante de la microestructura de las emulsiones. Debido a los fenómenos que ocurren en la fase continua y dispersa y que operan simultáneamente, las emulsiones se desestabilizan rápidamente por floculación, coalescencia parcial y total e incluso, liberación de aceite (*oiling off*). El notable incremento del tamaño de partícula debido a la floculación y coalescencia, favorece además la separación gravitacional por cremado una vez descongelada la emulsión (Ghosh y Coupland, 2008; McClements, 2004; Palazolo *et al.*, 2011; Márquez *et al.*, 2015). Por consiguiente, el incremento de la estabilidad de las emulsiones a la congelación se puede lograr a través del diseño de una membrana interfacial (“*interfacial engineering*”) que resista el estrés impuesto durante la congelación, además del agregado de azúcares y polioles, que actúan como crioprotectores (Thiebaud *et al.*, 2002; Thanasukarn *et al.*, 2004; Ghosh *et al.*, 2006; Fioramonti *et al.*, 2015; Palazolo *et al.*, 2016). Las emulsiones preparadas con concentrados de suero de tofu fueron sometidas a un tratamiento de congelación y almacenamiento congelado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h, con una descongelación a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. El tratamiento se realizó en ausencia de crioprotectores dado que los mismos, en especial cuando son agregados a alta concentración, inhiben las diferencias asociadas al tipo de emulsificante (Palazolo *et al.*, 2016). En la Figura 55 se presentan los diámetros promedio $D_{4,3}$ de las emulsiones iniciales y sometidas a congelación-descongelación; este parámetro es más sensible que el $D_{3,2}$ para detectar cambios en el tamaño de partícula debido a procesos de agregación (floculación, coalescencia y coalescencia parcial). Para las emulsiones elaboradas con todos los concentrados, se evidenció un aumento de $D_{4,3}$

luego del tratamiento de congelación-descongelación (Figuras 57 a, b). Cabe destacar que en las emulsiones no se observó *oiling off* luego de la descongelación y que el grado de desestabilización, a temperaturas similares de almacenamiento congelado y en ausencia de crioprotectores, fue notablemente inferior al observado en emulsiones preparadas con otras muestras (aislados proteicos de soja y de lactosuero) (Cabezas *et al.*, 2019; Palazolo *et al.*, 2011). Durante la congelación, la formación de hielo disminuye el volumen de la fase acuosa no congelada, conduciendo a una crioconcentración de los componentes de la fase acuosa de la emulsión. Esto puede generar cambios importantes en el pH y la fuerza iónica, con el consiguiente apantallamiento de las interacciones electrostáticas repulsivas entre las gotas. Este cambio abrupto en las condiciones del entorno puede ser suficientes para promover la desorción de los emulsificantes. Al mismo tiempo, las gotas son confinadas en un volumen pequeño de la fase acuosa no congelada facilitando el contacto prolongado entre las mismas y por ende, incrementando la probabilidad de agregación por floculación y coalescencia. Finalmente, los triglicéridos de la fase dispersa pueden cristalizar y los cristales formados, en conjunto con los de hielo, promueven la ruptura del film interfacial por daño mecánico (Ghosh y Coupland, 2008; McClements, 2004; Thanasukarn *et al.*, 2004). El aceite de girasol en estado libre comienza a cristalizar a $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un mecanismo de nucleación heterogénea; no obstante, cuando está finamente dividido en gotas, la cristalización en algunas gotas puede transcurrir por un mecanismo de nucleación homogénea induciendo un subenfriamiento, por lo que el aceite puede permanecer en estado líquido durante un período considerable. En base a que la temperatura promedio de congelación ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) es cercana a la de cristalización del aceite libre y a que el tiempo de almacenamiento congelado es relativamente corto (24 h), es altamente probable que la desestabilización de las emulsiones esté más asociada a la formación de hielo (Palazolo *et al.*, 2011). En estas condiciones, las emulsiones CST50 mostraron a todos los pH, un mayor incremento relativo de $D_{4,3}$ respecto a las preparadas con CST65 y CST80, con valores inferiores a 20% (Figura 56). Este resultado podría estar asociado a una serie de factores que operan simultáneamente: i) las emulsiones CST65 y CST80 exhibieron valores más elevados de $\%P_A$ y Γ (Tabla 18) y por ende, se formaría un film interfacial más resistente al estrés impuesto por la formación de hielo; ii) los concentrados CST65 y CST80, a diferencia de CST50, exhibieron una alta S_{HC} en el rango de pH 3,0–5,0 (Figura 36). Los polisacáridos concentrados en un pequeño volumen de la fase acuosa no congelada ejercerían un efecto estabilizante sobre la microestructura de las emulsiones debido a que el impedimento estérico minimiza el contacto entre las membranas interfaciales de las gotas durante el almacenamiento

congelado; iii) en trabajos previos vinculados al efecto de la congelación en emulsiones preparadas con aislados proteicos de soja o caseinato de sodio a distintas concentraciones de muestra, se ha descrito el efecto estabilizante de las proteínas no adsorbidas (Ghosh y Coupland, 2008; Palazolo *et al.*, 2011). Como se mencionó anteriormente, las emulsiones CST65 y CST80 exhibieron un $\%P_A$ mayor al de CST50 por lo que el menor grado de desestabilización de estas emulsiones no estaría asociado directamente con un contenido más elevado de proteínas no adsorbidas. No obstante, CST65 y CST80 tienen menor S_p y están constituidos por proteínas con mayor grado de agregación; los agregados no adsorbidos pueden contribuir a la estabilización.

Al mismo tiempo, al analizar la variación del incremento de $D_{4,3}$ en función del pH para cada concentrado, se observó un menor grado de desestabilización a pH 3,0 (Figura 56). A este pH las emulsiones mostraron menores valores de $D_{4,3}$ y de GF (Tabla 17). Las gotas más pequeñas pueden acomodarse con mayor efectividad en un volumen reducido de la fase acuosa no congelada, con una menor tendencia a sufrir una ruptura mecánica del film interfacial por la presencia de cristales de hielo (Ghosh y Coupland, 2008, Gu *et al.*, 2007, Palazolo *et al.*, 2011). Además, a pH 3,0, se observaron valores más elevados de $\%P_A$ y Γ respecto a los de pH 4,0 y 5,0 (Tabla 18); para CST65 y CST80, la contribución de partículas de mayor tamaño a la interfase de las gotas, asociadas también a un incremento de η^* en los ensayos de reología interfacial (Figura 50), favorecería la formación de una membrana resistente al estrés impuesto por el tratamiento de congelación-descongelación.

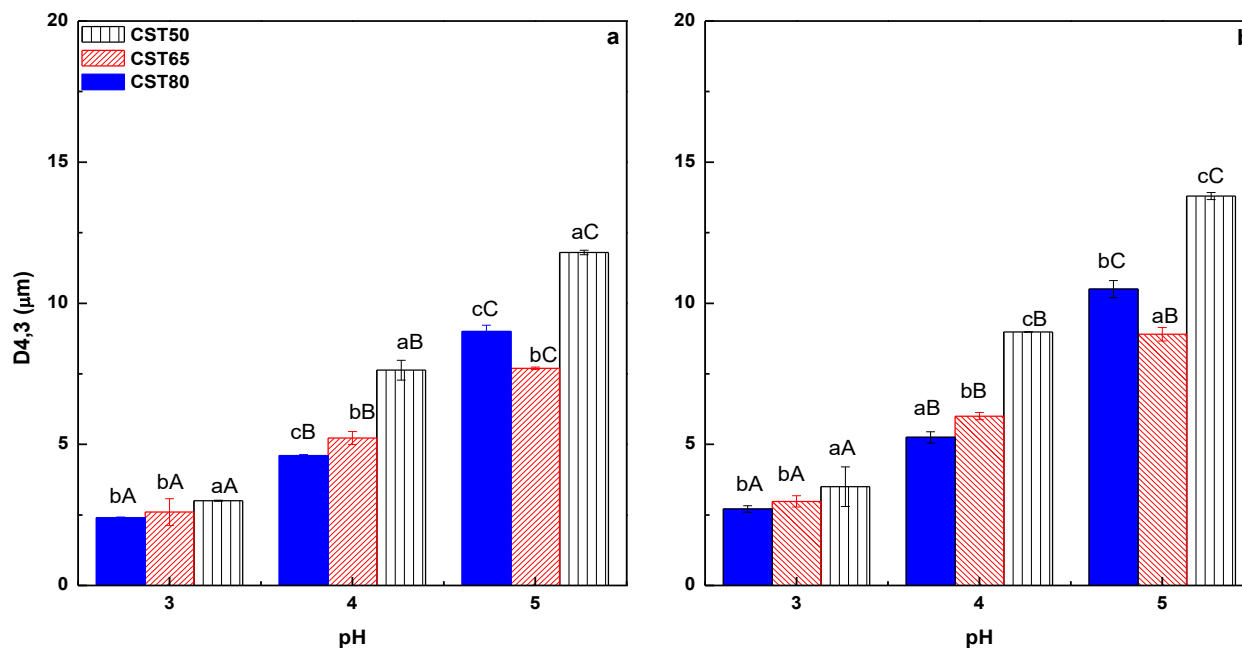


Figura 55: Diámetros promedios $D_{4,3}$ de las emulsiones CST50, CST65 y CST80: a) iniciales y b) sometidas a congelación-descongelación. Los valores se expresaron como el promedio de tres mediciones independientes ($n = 3$) $\pm$ desvío estándar. En la parte superior de las barras, las letras mayúsculas diferentes indican que las emulsiones de una misma muestra elaboradas a diferentes pH son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher. Las letras minúsculas indican que las emulsiones elaboradas al mismo pH, pero con concentrados diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher.

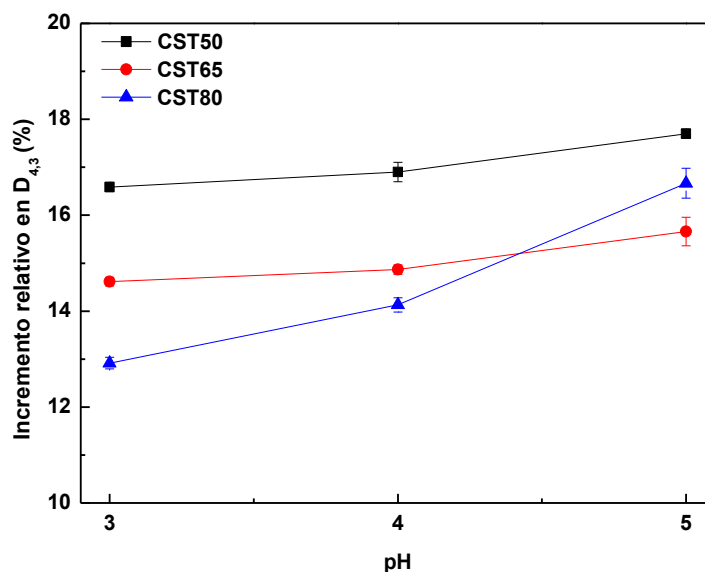


Figura 56: Incremento relativo (ecuación 51) en los diámetros promedio $D_{4,3}$ de las emulsiones CST50, CST65 y CST80, elaboradas en el rango de pH 3,0 a 5,0, sometidas a congelación-descongelación, respecto a las emulsiones iniciales.

2.2.3.2. Agitación mecánica

En emulsiones O/W preparadas con proteínas o muestras proteicas como agentes emulsificantes y en condiciones estacionarias de almacenamiento, la coalescencia es un proceso de desestabilización lento con relación al cremado y la floculación. No obstante, las emulsiones pueden sufrir agitación mecánica durante el transporte e incluso durante el almacenamiento, por lo que es de interés evaluar la estabilidad de emulsiones bajo condiciones de trabajo mecánico. A diferencia de la floculación, la coalescencia es un proceso de desestabilización irreversible. Esto ha sido la base de la propuesta de distintos ensayos acelerados de estabilidad de emulsiones, donde la coalescencia se promueve por la aplicación de procesos como la agitación y la centrifugación. El grado de desestabilización se evalúa en función del tiempo y/o la magnitud del esfuerzo aplicado (Britten y Giroux 1999; Mitidieri y Wagner 2002; McClements 2016; Palazolo, 2016). El tratamiento de agitación mecánica produce un incremento en la frecuencia de colisión (F_C) de las gotas, es decir, un aumento en la cantidad de eventos de colisión por unidad de masa o volumen de emulsión y de tiempo. En estas condiciones, la estabilidad de la emulsión está gobernada por la eficiencia de colisión

(E_C), parámetro asociado a la probabilidad de que las membranas interfaciales que cubren las gotas interactúen entre sí y sufran deformaciones o ruptura durante una colisión. La E_C depende de la intensidad y el tipo de interacciones coloidales, además de las características y la viscoelasticidad de la películas interfaciales (McClements, 2016). Un predominio de las interacciones coloidales atractivas incrementa notablemente la E_C , y por ende, un evento de colisión conduce a la agregación de las gotas por floculación, coalescencia o coalescencia parcial (en emulsiones donde la fase lipídica está parcialmente cristalizada). Finalmente, la E_C tiende a incrementarse con el aumento del tamaño de las gotas, debido a que las mismas exponen una mayor área para una colisión. Por lo tanto, la estabilidad de las emulsiones probablemente esté gobernada por el comportamiento de la población de gotas más grandes de la emulsión.

En el presente trabajo, para estudiar la estabilidad de las emulsiones frente al trabajo mecánico, se realizó una agitación orbital en condiciones controladas y se determinó la DTP cada 10 minutos, evaluando la variación temporal de los valores de $D_{4,3}$ por ser más sensibles a la presencia de partículas de mayor tamaño. Los resultados se muestran en la Figura 57. Las emulsiones preparadas con CST65 y CST80 exhibieron a pH 3,0 una alta estabilidad, con incrementos marginales de los diámetros promedio $D_{4,3}$ luego de 40 min de agitación; en cambio, se observó un constante incremento de este parámetro en las emulsiones CST50 (Figura 57a). En todos los sistemas formulados a pH 4,0 y 5,0, los valores de $D_{4,3}$ se incrementaron significativamente con el tiempo de tratamiento (Figura 57 b y c). Al final del ensayo, luego de detener la agitación, las emulsiones desestabilizadas exhibieron separación gravitacional por cremado, acorde al notable aumento del tamaño de las gotas. Como se mencionó anteriormente, las emulsiones exhibieron un comportamiento de flujo pseudoplástico (Figura 54, Tabla 19). Aunque las condiciones de esfuerzo en el reómetro y en el agitador orbital no son comparables, es altamente probable que la agitación mecánica reduzca notablemente la viscosidad en todas las emulsiones, por lo que no habría diferencias sustanciales en la F_C en cada condición.

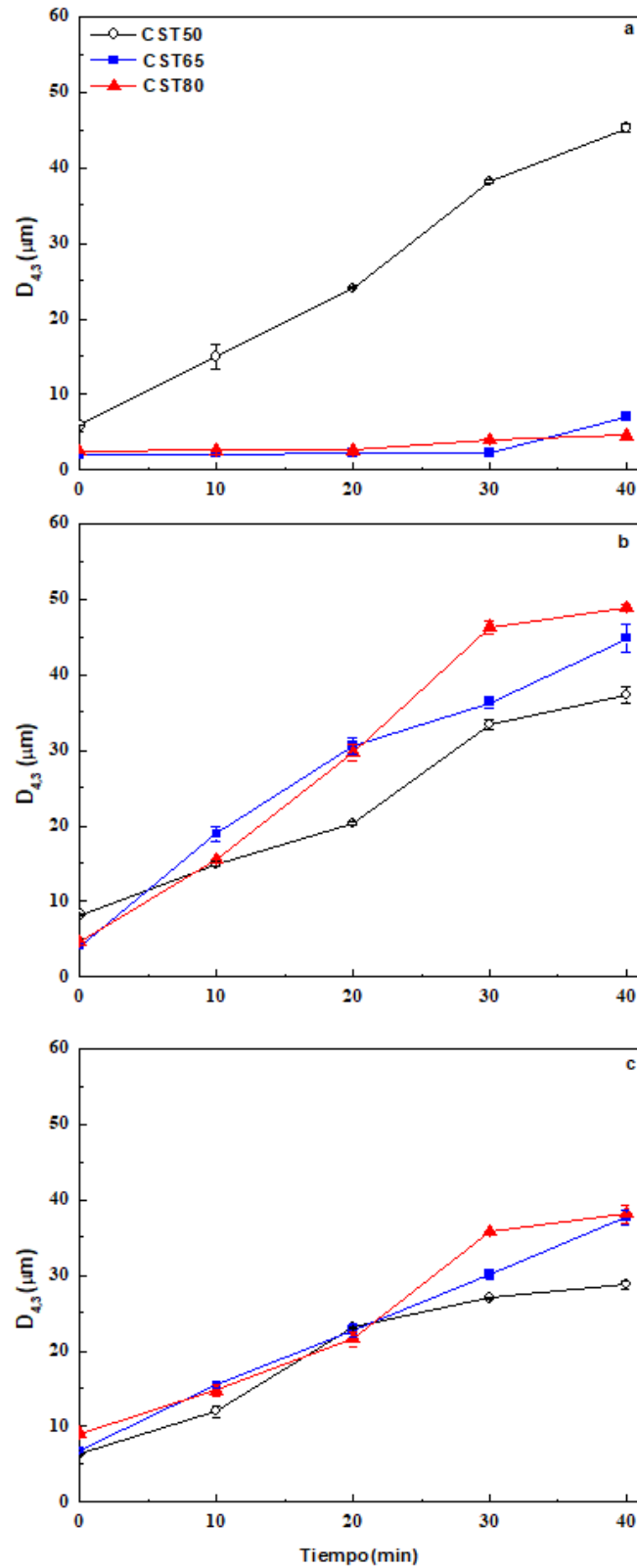


Figura 57: Efecto de la agitación orbital (275 r.p.m., 25°C) sobre los diámetros promedio $D_{4,3}$ de emulsiones elaboradas con concentrados de suero de tofu bajo presión reducida a 50°C (CST50), 65 °C (CST65) y 80°C (CST80) y ajustadas a pH entre 3,0 a 5,0. **a)** pH 3,0, **b)** pH 4,0 y **c)** pH 5,0

A pH 5,0 todos los concentrados mostraron un potencial- ζ levemente negativo y a pH 4,0 este parámetro fue ~ 0 mV (Figura 35) por la cercanía al punto isoeléctrico de las proteínas del suero y reserva de soja (Sorgentini y Wagner 1999). En estas condiciones, la E_C sería elevada debido a la baja contribución de la repulsión electrostática y el predominio de las interacciones atractivas, como las hidrofóbicas, lo cual lleva a la ruptura de las membranas interfaciales por colisión durante la agitación. A pH 3,0, las emulsiones iniciales mostraron valores menores de $D_{4,3}$ y GF (Tabla 15). Además, las dispersiones de los concentrados exhibieron un potencial- ζ positivo, siendo levemente más alto en CST65 y CS80 (Figura 35, Tabla 15). Aunque la reducción del tamaño de las partículas disminuye la E_C , la alta estabilidad de las emulsiones CST80 y CST65 en relación con las preparadas con CST50 estaría asociada fundamentalmente a distintos fenómenos interdependientes y que operan simultáneamente: i) la formación de membranas interfaciales de mayor viscoelasticidad, como fue propuesto en trabajos previos (Britten y Giroux, 1999; Mitidieri y Wagner, 2002; Palazolo, 2006). De hecho, las dispersiones acuosas de CST80 y CST65 mostraron los mayores valores de η^* en los ensayos de reología interfacial (Figura 50); ii) la mayor $\%P_A$ y Γ (Tabla 18), por adsorción de agregados de mayor tamaño presentes en las dispersiones de CST65 y CST80, que aumentan la intensidad de la repulsión estérica. La presencia de polisacáridos solubles, asociados a una alta S_{HC} a pH 3,0 (Figura 36), podrían promover una estabilización estérica transitoria actuando en los canales de líquido de fase continua que separan a las gotas en el momento de la colisión. Estos fenómenos contribuirían a la disminución de la E_C , promoviendo la estabilización de las emulsiones frente a la agitación mecánica.

2.2.3. Propiedades interfaciales y emulsificantes de los concentrados obtenidos a partir de suero de tofu neutralizado

2.2.3.1. Efecto del pH sobre el tamaño de partícula de las dispersiones acuosas

En la Figura 58 se presentan las distribuciones de tamaño de partícula (DTP) de las dispersiones acuosas de los concentrados obtenidos a partir del STN (CST50_{aj} y CST80_{aj}), medidas por SLS (Sección 2.1.1), las cuales se expresaron como porcentaje en volumen y en superficie. Se puede observar que, en todos los pH, las distribuciones en volumen presentaron una población de partículas con diámetros inferiores a 2,0 μm y otra población mayoritaria, con un rango amplio de diámetros entre 2 μm y 500 μm , acorde a un alto grado de polidispersidad de las DTP. Para CST80_{aj} las DTP fueron bimodales; en cambio, para CST50_{aj}, la DTP en volumen exhibió una población mayoritaria con dos picos solapados (Figura 60 a, c y e). Además, a cada valor de pH se evidenció que en el concentrado obtenido con un tratamiento térmico a mayor temperatura (CST80_{aj}), se promovió la formación de partículas de mayor tamaño, acorde al desplazamiento de la moda en la población mayoritaria hacia diámetros mayores de partícula y el incremento en los valores de los diámetros promedio $D_{3,2}$, $D_{4,3}$ y el percentil $D_{v0,9}$ (Tabla 20).

Esta misma tendencia ya se había observado en las DTP con los concentrados obtenidos a partir del ST sin ajuste de pH (Figura 49), donde también se observaron los mayores valores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ en CST80 (Tabla 15). No obstante, en los concentrados preparados a partir del STN, hay una reducción significativa en los valores de los diámetros promedio a todos los pH (Tablas 15 y 20), lo cual se asocia al menor estado de agregación que presentan, debido a la pérdida de calcio durante la etapa de diálisis (Tabla 12).

En las DTP en superficie, se evidenció que las dispersiones acuosas de ambas dispersiones tienen una población mayoritaria con partículas de diámetros inferiores a 2 μm y de acuerdo con los valores de $D_{s0,9}$, el 90% del área total se distribuyó en partículas con un tamaño inferior a 35 μm (Figura 58 b, d y f; Tabla 20).

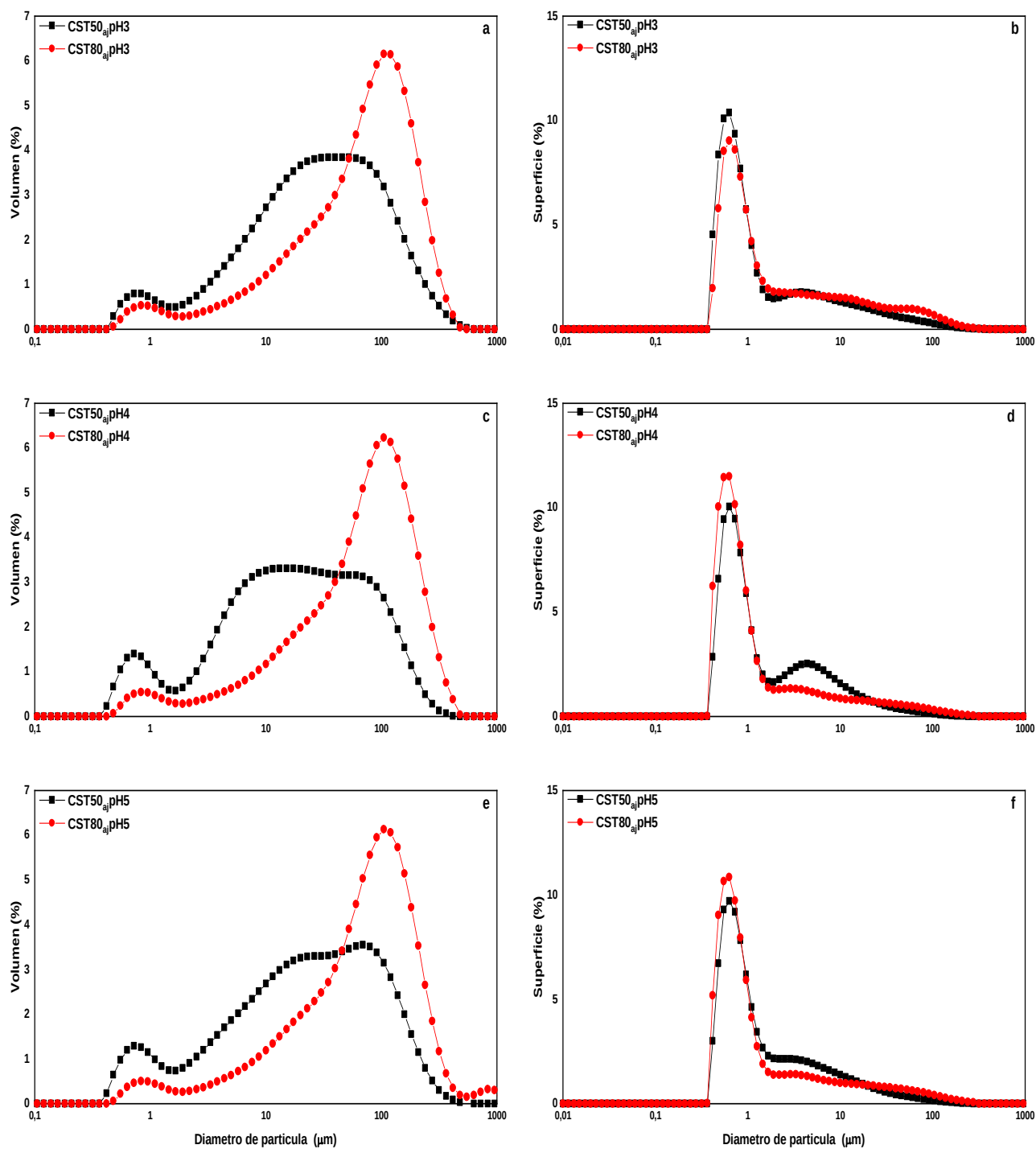


Figura 58: Distribución de tamaño de partícula de dispersiones acuosas de concentrados proteicos de suero de tofu neutralizados obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu a presión reducida a 50 °C (CST50_{aj}) y 80 °C (CST80_{aj}). En volumen: a) pH 3,0, c) pH 4,0 y e) pH 5,0. En superficie: b) pH 3,0, d) pH 4,0 y f) pH 5,0.

De acuerdo con las curvas de turbidez en agua destilada, los valores máximos de turbidez se observaron a pH 4,0, y el de potencial- ζ fue cercano a 0 mV al mismo pH (Figuras 43a y 44). Además, de la variación de la S_p y S_{HC} con el pH (Figura 45) surge que el volumen y área absoluta de las partículas insolubles en las dispersiones acuosas registran variaciones a cada pH. En este trabajo se observó que los CST50_{aj} y CST80_{aj} exhibieron la menor S_p a pH 4,0 (Figura 45), lo que indica una mayor auto-asociación promovida por una reducción de las repulsiones electroestáticas. Por ende, a pH 4,0 se generan nuevas poblaciones de partículas insolubles con tamaño más pequeño, lo cual, se tradujo en una disminución de $D_{3,2}$, $D_{4,3}$, $D_{v0,9}$ y $D_{s0,9}$, en relación con los valores obtenidos a pH 3,0 y 5,0 ($p < 0,05$, Tabla 20).

Tabla 20: Diámetros promedio de Sauter ($D_{3,2}$), de De Brouckere ($D_{4,3}$) y percentiles del 90% de la distribución tamaño de partícula en volumen ($D_{v0,9}$) y en superficie ($D_{s0,9}$) de las dispersiones acuosas de concentrados de suero de tofu neutralizado obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu a presión reducida a 50 °C (CST50_{aj}), y 80 °C (CST80_{aj}).

Muestra	pH	$D_{3,2}$ (μm)	$D_{4,3}$ (μm)	$D_{v0,9}$ (μm)	$D_{s0,9}$ (μm)
CST50 _{aj}	3,0	$7,0 \pm 0,1^c$	$53,1 \pm 0,2^c$	$138,1 \pm 0,8^c$	$17,2 \pm 0,4^c$
	4,0	$4,7 \pm 0,2^a$	$39,9 \pm 0,2^a$	$109,3 \pm 0,5^a$	$9,5 \pm 0,1^a$
	5,0	$5,1 \pm 0,2^b$	$48,2 \pm 0,4^b$	$130,1 \pm 1,0^b$	$10,2 \pm 0,3^b$
CST80 _{aj}	3,0	$12,2 \pm 0,3^c$	$92,0 \pm 0,3^b$	$215,2 \pm 0,9^b$	$33,3 \pm 0,5^c$
	4,0	$6,6 \pm 0,2^a$	$84,7 \pm 0,3^a$	$200,1 \pm 1,3^a$	$12,1 \pm 0,2^a$
	5,0	$8,7 \pm 0,2^b$	$97,3 \pm 0,6^c$	$229,9 \pm 0,8^c$	$17,8 \pm 0,2^b$

Los valores se expresaron como el promedio de tres determinaciones independientes ($n = 3$) $\pm$ desvío estándar. Los valores promedio en una misma columna seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes para cada tipo de CST ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher.

Para CST50_{aj}, la DTP en volumen evidenció un mayor volumen relativo de partículas con tamaño entre 2 y 10 μm y, además, una mayor área asociada a este rango en la DTP en superficie (Figura 58 c y d); esta misma tendencia se observó para el concentrado obtenido a 50 °C sin neutralización del ST (Figura 49 c, d). En CST80_{aj}, al igual que en CST80, la aparición de una nueva población de partículas insolubles a pH 4,0 se evidenció en una reducción de los diámetros promedio y los percentiles (Tabla 20). Como se mencionó en la sección 2.2.1.1, la aparición de nuevas poblaciones insolubles en la DTP por efecto de la adición de sales de

calcio, fue reportado por Márquez *et al* (2018) en emulsiones tipo crema elaborada con harina desgrasada de soja. No obstante, en CST50_{aj} y CST80_{aj} este efecto es menos pronunciado debido a que durante la neutralización del ST, se promueve una menor asociación entre Ca^{2+} y los biopolímeros y, por ende, habría una mayor pérdida del ión divalente durante la diálisis, obteniendo concentrados con menor contenido de calcio total. La carga superficial neta en las dispersiones acuosas ajustadas a pH en los CST50_{aj} y CST80_{aj}, presentó valores positivos (Figura 44), lo cual disminuyó la contribución de las partículas insolubles formadas a pH 4,0 en el volumen total en la DTP (Figura 58a). Sin embargo, a las mismas condiciones en ambos concentrados (pH 3,0), en la DTP en superficie se evidenció una mayor proporción relativa del área total distribuida en partículas de mayor tamaño acorde a los valores significativamente más elevados del percentil $D_{s0,9}$ (Figura 58b y Tabla 20).

2.2.3.2. Comportamiento interfacial de los concentrados del suero de tofu neutralizado en interfase agua/aceite

Los resultados de los ensayos de presión interfacial en equilibrio (π_i), para las dispersiones acuosas de CST50_{aj} y CST80_{aj} se presentan en la Tabla 21. Para CST50_{aj} a pH 4,0 y 5,0 se observaron valores similares de π_i ($p > 0.05$) y en CST80_{aj} se observó una pequeña pero significativa diferencia en los valores de presión interfacial (Tabla 21, $p < 0.05$). A pH 3,0 se observó para ambos concentrados una reducción del parámetro interfacial ($p < 0,05$). Como se había observado en la DTP en superficie, las partículas insolubles en estas muestras a todos los pH ensayados tienen mayoritariamente diámetros inferiores a 2,0 μm . Sin embargo, a pH 3,0 se observó una mayor contribución de partículas con tamaños entre 2,0 a 10,0 μm (Figura 58 e y f). En conjunto, el incremento de la repulsión electrostática y la presencia de partículas de mayor tamaño a pH 3,0, se asociarían a la reducción de la actividad interfacial en los concentrados a este pH. Además, entre los concentrados solo se observan ligeras diferencias en los valores de π_i al mismo pH. Los valores de S_p y presión interfacial en el rango de pH 3,0 a 5,0 no mostraron tener correlación (Figura 45), por lo tanto, la π_i estaría influenciada por la adsorción de partículas insolubles, siendo esta misma tendencia observada para los concentrados preparados a partir del ST sin ajuste de pH (CST50 y CST80).

La actividad interfacial de los concentrados también se monitoreó mediante la evolución de la viscosidad compleja (η^*) de la interfase aceite/agua en función del tiempo. En

la Figura 59 se observan los perfiles de η^* , que alcanzan valores cercanos al máximo al inicio del ensayo en todos los pH. Esto estaría indicando una rápida formación de la monocapa, por difusión, adsorción y reordenamiento interfacial de los biopolímeros presentes en los concentrados (Baldursdottir *et al.*, 2010; Baldursdottir y Jorgensen, 2011).

Tabla 21: Efecto del pH sobre presión interfacial de equilibrio (π_i) de los concentrados de suero de tofu neutralizados obtenidos por tratamiento del suero de tofu a presión reducida a 50 °C (CST50_{aj}), y 80 °C (CST80_{aj}).

Presión interfacial (π_i , mN/m)		
pH	CST50 _{aj}	CST80 _{aj}
3,0	8,19 ± 0,08 ^{aA}	8,48 ± 0,14 ^{aB}
4,0	8,50 ± 0,12 ^{bA}	8,99 ± 0,10 ^{cB}
5,0	8,40 ± 0,10 ^{bA}	8,70 ± 0,08 ^{bB}

Los valores de presión interfacial se expresaron como la media de tres mediciones independientes ($n = 3$) ± desviación estándar. Los valores medio de una misma columna seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher. Los valores medios de una misma fila seguidos de letras mayúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según lo determinado por la prueba de Fisher.

Los módulos de viscosidad compleja obtenidos al final del ensayo en cada concentrado fueron diferentes en función del pH. Sin embargo, a los pH 4,0 y 5,0 no se evidenció diferencias en los módulos de η^* entre CST50_{aj} y CST80_{aj} (Figura 59 b y c). A pH 3,0 se observó un incremento en los valores de η^* ; además la viscoelasticidad del film interfacial de CST80_{aj} fue mayor respecto a CST50_{aj} (Figura 59a). Este resultado se relaciona con el mayor contenido de partículas de gran tamaño presentes en los concentrados con un tratamiento térmico a mayor temperatura, que se adsorben en la interfase aceite/agua, incrementando los valores de η^* . Estos resultados se relacionan con el valor obtenido de $D_{s0,9}$ de CST80_{aj}, que fue significativamente superior al de CST50_{aj} (Tabla 20). CST80_{aj} tiene una S_p más baja y al mismo tiempo una S_{HC} mayor que CST50_{aj}, asociado a la presencia de una fracción de partículas insolubles más ricas en proteínas y con menor asociación a polisacáridos (Figuras 45 y 46). Estas interacciones más intensas entre moléculas de proteína de las partículas adsorbidas favorecerían el incremento de η^* .

Los valores de los módulos de η^* obtenidos con los concentrados CST50_{aj} y CST80_{aj} respecto a los de CST50 y CST80, fueron inferiores a todos los pH ensayados (Figuras 50 y 59). Como se ha mencionado a lo largo de esta sección los concentrados obtenidos a partir del

STN tienen un menor contenido de partículas insolubles, por lo tanto, disminuye la viscoelasticidad de las membranas interfaciales en relación con las de CST50 y CST80.

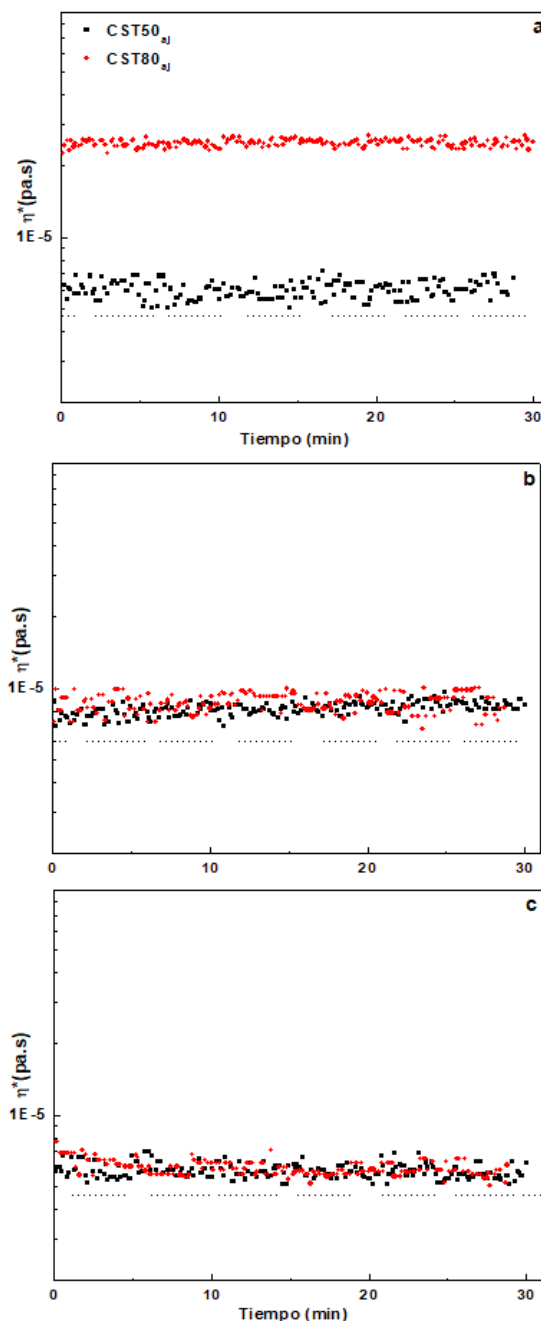


Figura 59: Perfiles de viscosidad compleja (η^*) en función del tiempo, en la interfase aceite/agua para los concentrados de suero de tofu neutralizados obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu a presión reducida a 50 °C (CST50_{aj}), y 80 °C (CST80_{aj}): a) pH 3,0, b) pH 4,0 y c) pH 5,0. Los ensayos fueron realizados a una concentración de proteína equivalente en las dispersiones (1,0 % P/P). Los valores fueron expresados como el promedio de tres mediciones independientes ($n=3$) $\pm$ desvío estándar.

2.2.3.3. Caracterización de emulsiones iniciales

2.2.3.3.1. Distribución de tamaño de partícula y microestructura

En la Figura 60 se presentan las distribuciones de tamaño de partícula en volumen, para las emulsiones iniciales sin y con sonicación previa, formuladas con dispersiones acuosas de CST50_{aj}, ajustadas en el rango de pH de 3,0 a 5,0. Cabe destacar, que el tratamiento de sonicación es de baja intensidad y se realiza sobre la emulsión diluida, evitando la creación de nueva área interfacial (Porfiri *et al.*, 2016; Cabezas *et al.*, 2017). Todas las emulsiones, independientemente del tratamiento de sonicación, presentaron distribuciones de carácter bimodal. Además, se observó que al incrementar el pH 3,0 a 5,0, hay un desplazamiento de las modas hacia mayores diámetros de partícula. Estos resultados se relacionan con un incremento significativo de los diámetros promedio $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ al ajustar el pH de 3,0 a 5,0 ($p < 0,05$, Tabla 22). El tratamiento de sonicación que se realizó en las emulsiones previo a la medición de la DTP, desplazó las modas en todas las emulsiones hacia diámetros de partícula menores, resultado acorde a la ruptura de flóculos durante la sonicación (Porfiri *et al.*, 2016; Cabezas *et al.*, 2017).

En este contexto, por medio de microscopía óptica, se observó en todas las emulsiones la presencia de flóculos, no obstante, de forma cualitativa se evidenció que a pH 4,0 y 5,0, el tamaño de las partículas fue mayor (Figura 60), lo que se relaciona con los valores más elevados de la moda y de los diámetros promedio $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ debido al mayor GF (Tabla 22).

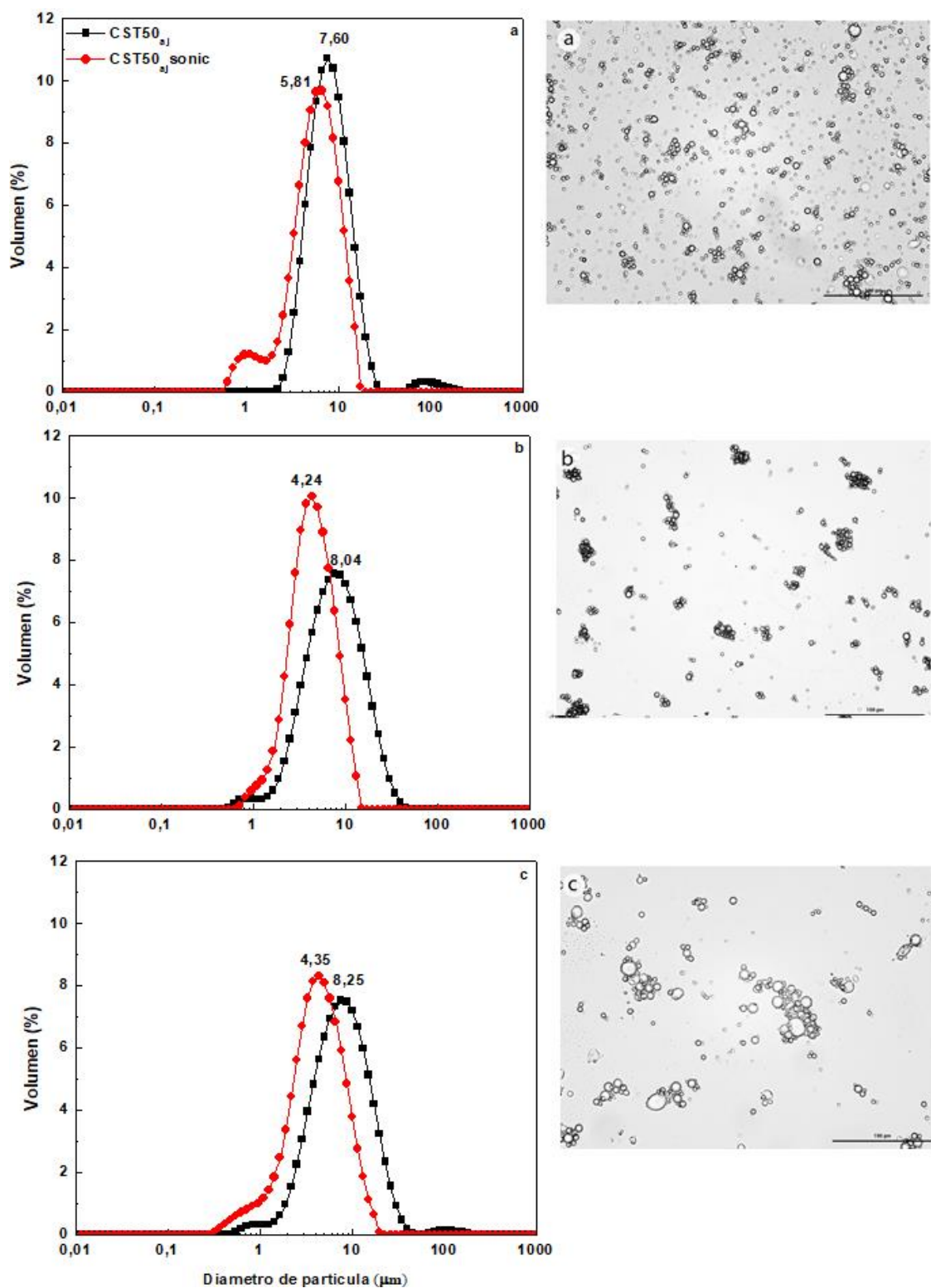


Figura 60: Distribuciones de tamaño de partícula medidas con y sin sonicación y microestructura de emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas (1,0% proteína P/P) de CST50_{aj}: a) pH 3,0, b) pH 4,0 c) pH 5,0. Para el análisis de la microestructura (aumento: 200×), las emulsiones se diluyeron 1:20 V/V con agua destilada ajustada al mismo pH de las emulsiones. Barra: 100 μm.

Tabla 22: Diámetros promedios de Sauter ($D_{3,2}$) y De Brouckere ($D_{4,3}$) obtenidos a partir de las distribuciones de tamaño de partícula de emulsiones O/W medidas sin sonicación previa y preparadas con dispersiones acuosas de CST50_{aj} y CST80_{aj} (1,0 % P/P de proteína, pH 3,0, 4,0 y 5,0). El grado de floculación (GF) se obtuvo a partir de los valores de $D_{4,3}$ sin y con sonicación (ecuación 52).

CST50 _{aj}							
pH	3,0	4,0	5,0	pH	3,0	4,0	5,0
D_{4,3} (μm)	8,2±0,3 ^{bA}	8,7±0,5 ^{bA}	9,5±0,1 ^{aB}	D_{3,2} (μm)	5,2±0,1 ^{bA}	5,2±0,1 ^{bB}	5,8±0,1 ^{bC}
GF (%)	40,6±0,5 ^{bA}	87,5±0,9 ^{bB}	104,3±1,1 ^{bC}				
CST80 _{aj}							
pH	3,0	4,0	5,0	pH	3,0	4,0	5,0
D_{4,3} (μm)	4,9±0,2 ^{aA}	7,2±0,1 ^{aB}	9,4±0,2 ^{aC}	D_{3,2} (μm)	3,0±0,1 ^{aA}	3,3±0,1 ^{Ab}	3,2±0,1 ^{aB}
GF (%)	25,4±0,1 ^{aA}	32,0±0,2 ^{aB}	38,8±0,5 ^{aC}				

Los valores se expresaron como la media de tres mediciones independientes ($n = 3$) ± desviación estándar. Los valores medio de una misma columna seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher. Los valores medios de una misma fila seguidos de letras mayúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según lo determinado por la prueba de Fisher

La DTP de las emulsiones CST80_{aj} mostró un carácter monomodal para las emulsiones elaboradas a los pH 3,0 y 4,0 y una distribución bimodal para la emulsión ajustada a pH 5,0 (Figura 61), con una población principal de partículas con diámetros mayores a 3,0 μm y una población minoritaria de partículas con diámetros mayores a 50 μm. Al igual que en las emulsiones preparadas con CST50_{aj}, el incremento de pH aumento los valores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ (Tabla 22). Por microscopia se observó la presencia de flóculos en las emulsiones, no obstante, se evidenció un menor grado de floculación en las emulsiones elaboradas a pH 3,0 (Tabla 22). Al comparar la DTP de las emulsiones entre los concentrados del STN al mismo pH, se evidenció que las elaboradas con CST80_{aj}, presentaron valores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ menores a los obtenidos con CST50_{aj} (Figura 60 y 61). Este resultado indica un mejor comportamiento como emulsificante del concentrado obtenido con un tratamiento térmico a mayor temperatura; esta misma tendencia se observó en los concentrados obtenidos a partir del ST sin neutralización (Sección 2.2.2.1).

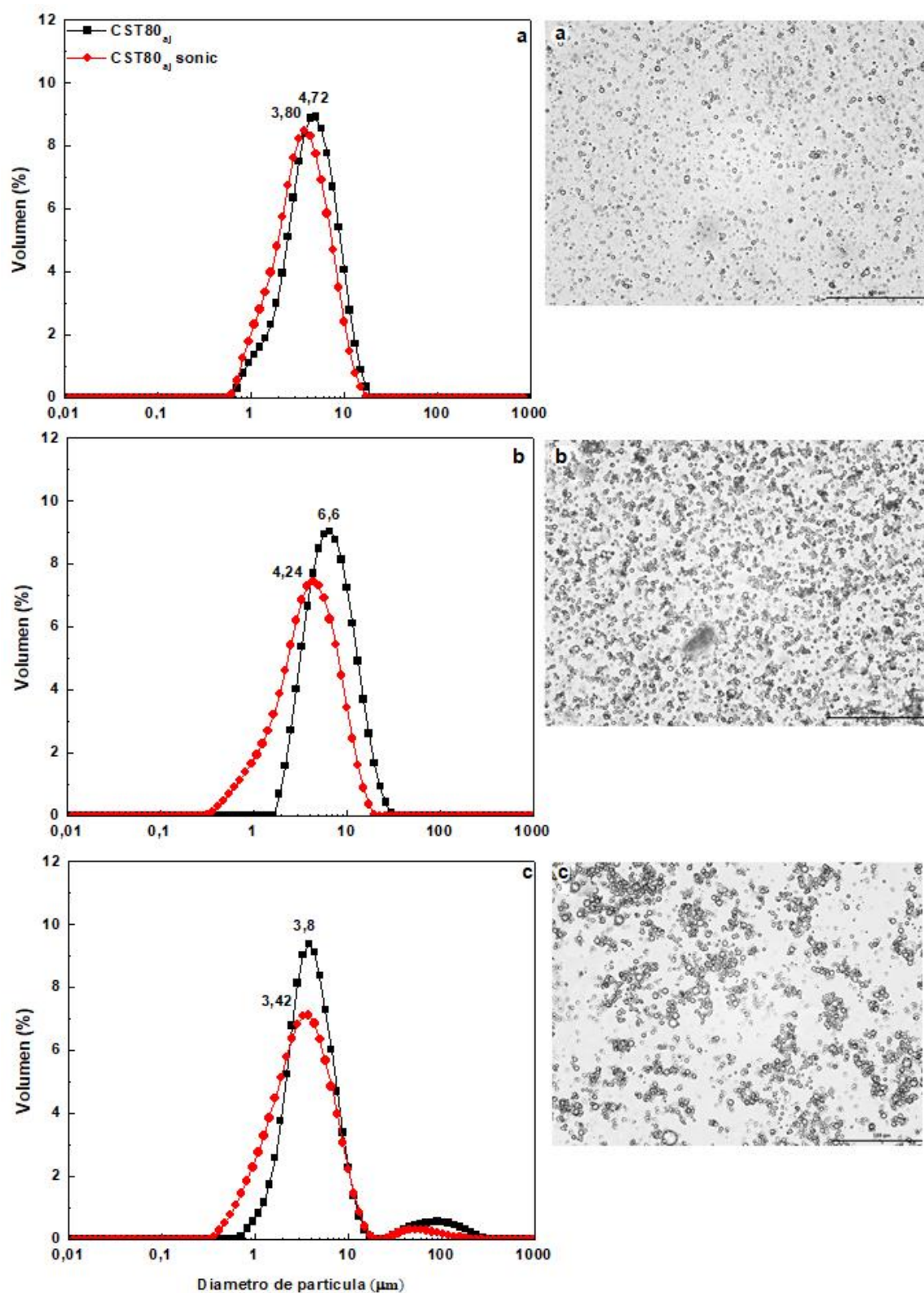


Figura 61: Distribuciones de tamaño de partícula medidas con y sin sonicación y microestructura de emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas (1,0% proteína P/P) de CST80_{aj}: a) pH 3,0, b) pH 4,0 c) pH 5,0. Para el análisis de la microestructura (aumento: 200×), las emulsiones se diluyeron 1:20 V/V con agua destilada ajustada al mismo pH de las emulsiones. Barra: 100 μm.

Como fue descrito en la sección 2.2.2.1 el mejor comportamiento emulsificante de los concentrados a pH 3,0 no está relacionado con la mayor actividad interfacial, debido a que los valores de presión interfacial (π_i) fueron significativamente menores que los observados a los pH 4,0 y 5,0 en ambos concentrados ($p < 0,05$, Tabla 21). Por lo tanto, el incremento de la capacidad emulsificante, debido a una disminución de los procesos de re-coalescencia y floculación por puenteo durante la homogeneización, se atribuye a la presencia de agregados de mayor tamaño presentes en ambos concentrados a pH 3,0, promoviendo la formación de emulsiones con menor tamaño de partícula y GF en relación con los de las preparadas a pH 4,0 y 5,0.

Cabe destacar que las emulsiones formuladas con CST50_{aj} y CST80_{aj}, exhibieron mayores diámetros promedio $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ y valores mayores de GF a todos los pH, respecto a los obtenidos con los concentrados a la misma temperatura, pero con el ST sin neutralización (Tablas 17 y 22). Estos resultados se asocian al menor contenido de partículas agregadas en CST50_{aj} y CST80_{aj}, lo cual reduce significativamente la re-coalescencia y la floculación durante el proceso de homogeneización.

2.2.3.3.2. Porcentaje de proteína adsorbida y concentración de proteína interfacial

Los valores de concentración de proteína interfacial (Γ) y del porcentaje de proteína adsorbida (%P_A), de las emulsiones elaboradas con los concentrados CST50_{aj} y CST80_{aj} se presentan en la Tabla 23. En ambos concentrados el mayor %P_A se observó a pH 3,0; no obstante para el concentrado obtenido a 80 °C este parámetro fue significativamente mayor, respecto a los valores de CST50_{aj} a los mismos pH ($p < 0,05$). Se sabe que %P_A y Γ están influenciados por la adsorción de proteínas solubles y además por la presencia de partículas insolubles. Los valores de S_p en el rango de pH 3,0–5,0 fueron mayores para CST50_{aj}, (Figura 45), sin embargo, para CST80_{aj} el %P_A fue superior en todo el rango de pH. Por lo tanto, es posible inferir que, durante el proceso de homogeneización, el ingreso a la interfase aceite/agua de partículas insolubles promovería el incremento del %P_A posterior a la homogeneización. En las dispersiones acuosas ajustadas a pH 3,0, el aporte de partículas con un mayor tamaño, determinado mediante el percentil $D_{50,9}$ (Tabla 20), se relaciona con el mayor %P_A en las emulsiones posterior a la homogeneización. Mediante los ensayos de reología interfacial se evidenció que a pH 3,0, las dispersiones acuosas exhiben mayores valores de η^* , lo cual está relacionado directamente con la adsorción de partículas insolubles de mayor tamaño. Sin

embargo, esto sólo se evidenció claramente para el CST80_{aj}, donde η^* fue significativamente mayor (Figura 59).

Tabla 23: Porcentaje de proteína adsorbida (% P_A) y concentración de proteína interfacial (Γ) de las emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas (1,0% proteína ^P/_P, pH 3,0, 4,0 y 5,0) de concentrados de suero de tofu neutralizados obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu a presión reducida a 50 °C (CST50_{aj}) y 80 °C (CST80_{aj}).

Muestra	pH	Proteína adsorbida (%P _A)	Concentración de proteína interfacial (Γ , mg/m ²)
CST50 _{aj}	3,0	38,47 ± 0,11 ^c	2,09 ± 0,07 ^c
	4,0	36,61 ± 0,17 ^b	1,92 ± 0,10 ^b
	5,0	33,71 ± 0,20 ^a	1,70 ± 0,08 ^a
CST80 _{aj}	3,0	44,07 ± 0,31 ^c	2,22 ± 0,04 ^c
	4,0	42,58 ± 0,23 ^b	2,18 ± 0,07 ^b
	5,0	41,74 ± 0,25 ^a	1,75 ± 0,08 ^a

Los valores se expresaron como el promedio de tres determinaciones independientes ($n = 3$) ± desvío estándar. Los valores promedio en una misma columna seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes para un mismo CST ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher

En las emulsiones preparadas a pH 3,0 en ambos concentrados, los valores de Γ fueron significativamente superiores a los demás pH ($p < 0,05$, Tabla 23), resultados que se relacionan con los menores valores de $D_{3,2}$ (Puppo *et al.*, 2005). Entre los concentrados con y sin proceso de neutralización se observó diferencias en los valores de %P_A y Γ , siendo mayores los valores de los parámetros mencionados en los concentrados sin neutralizar (CST50 y CST80) (Tablas 18 y 23). Como se mencionó anteriormente la presencia de agregados y la mayor adsorción de los mismos en la interfase, incrementa el %P_A. Por medio de las DTP de las dispersiones acuosas se sabe que los concentrados obtenidos a partir del ST sin neutralizar tienen partículas insolubles de mayor tamaño (Tablas 15 y 20), lo cual incrementa los valores de los parámetros mencionados.

2.2.3.3.3. Comportamiento de flujo

La variación de la viscosidad aparente en función de la velocidad de deformación para las emulsiones elaboradas con los concentrados CST50_{aj} y CST80_{aj} ajustadas en el rango de pH 3,0–5,0 se muestra en la Figura 62. Los resultados indican que las emulsiones presentan un comportamiento de fluido pseudoplástico. Además, en todas las emulsiones descendió la viscosidad aparente a bajas velocidades de deformación, relacionándose con la presencia de flóculos (Figuras 60 y 61), los cuales sufren deformación y ruptura durante el ensayo (Dickinson, 1994; McClements, 2016; Tadros, 2004). Las curvas de flujo obtenidas fueron modeladas mediante la ley de Potencia, mostrando en todos los casos un valor de R^2 cercano a 1,0. En la Tabla 24 se observa un incremento en los valores del índice de consistencia (K) al ajustar el pH de 3,0 a 5,0 y a la vez se evidenció una reducción significativa en los valores de n ($p < 0,05$).

Paras las emulsiones elaboradas con el CST50_{aj} a todos los pH, los valores de K fueron mayores al de las emulsiones preparadas con CST80_{aj} ($p < 0,05$). Esta misma tendencia se observó al comparar los valores de K de las emulsiones CST50 y CST80 (Tabla 19). El incremento en los valores de K y la reducción en el índice de comportamiento de flujo, se podría relacionar con un incremento en el GF de las emulsiones (Tabla 22), que fue más notable al comparar los parámetros reológicos de las emulsiones obtenidas a pH 3,0, respecto a los demás pH en ambos concentrados. Al comparar los valores de K y n de las emulsiones preparadas con los concentrados CST80 y CST80_{aj}, se puede observar que solo hay ligeras diferencias entre los índices (Tablas 19 y 22 $p < 0,05$). No obstante, entre CST50 y CST50_{aj}, los valores de K fueron inferiores a todos los pH para CST50. Este resultado se atribuyó nuevamente a diferencias en el GF de las emulsiones que fue mayor para CST50_{aj} a todo los pH (Tablas 19 y 22).

Tabla 24: Constantes reológicas del modelo de ley de potencia (K: índice de consistencia y n: índice de comportamiento de flujo) para las emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas (1,0% P/P de proteína, pH 3,0, 4,0 y 5,0) de concentrados de suero de tofu neutralizado obtenidos por tratamiento térmico del suero de tofu a presión reducida a 50 °C (CST50_{aj}) y 80 °C (CST80_{aj}).

CST50 _{aj}			
pH	3,0	4,0	5,0
K	0,16±0,01 ^{bA}	0,23±0,03 ^{bB}	0,33±0,04 ^{bC}
n	0,84±0,02 ^{aC}	0,50±0,02 ^{aA}	0,43±0,03 ^{aA}
CST80 _{aj}			
pH	3,0	4,0	5,0
K	0,05±0,01 ^{aB}	0,09±0,01 ^{aA}	0,14±0,02 ^{aA}
n	0,92±0,09 ^{bC}	0,66±0,02 ^{bB}	0,52±0,07 ^{bA}

Los valores se expresaron como el promedio de tres mediciones independientes ($n = 3$) $\pm$ desvío estándar. Los valores promedio en una misma columna seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher. Los valores promedio en una misma fila seguidos de letras mayúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según lo determinado por la prueba de Fisher.

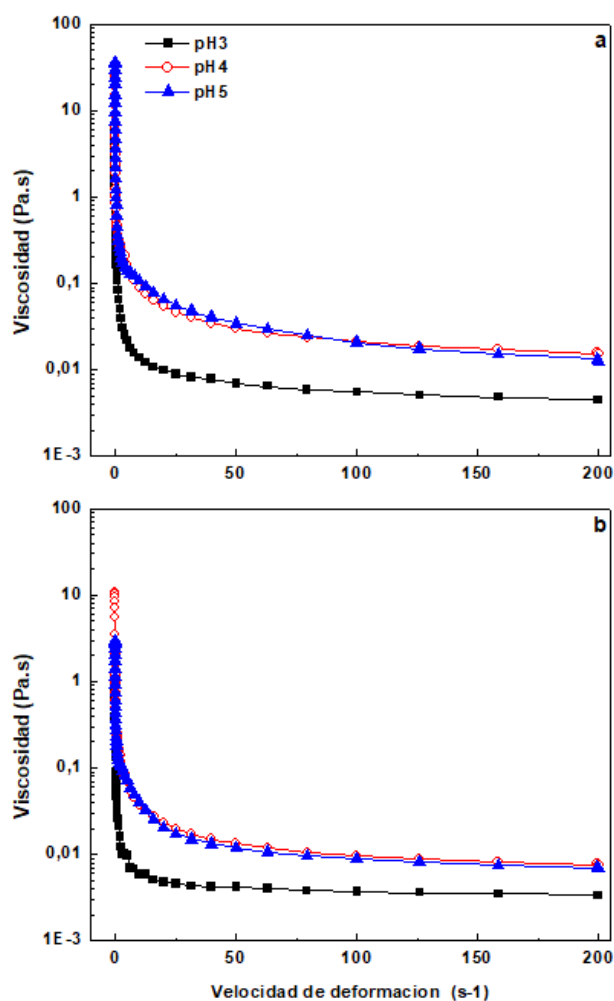


Figura 62: Comportamiento de flujo de emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas de concentrados suero de tofu neutralizados (1,0% P/P de proteína, pH 3,0, 4,0 y 5,0): a) CST50_{aj} y b) CST80_{aj}.

2.2.3.4. Evaluación de la estabilidad de las emulsiones frente a los tratamientos tecnológicos

2.2.3.4.1. Congelación-descongelación

En la Figura 63 se presentan los valores $D_{4,3}$ de las emulsiones iniciales y luego de la congelación-descongelación, elaboradas con CST50_{aj} y CST80_{aj}. Luego del tratamiento se observó un incremento en los valores $D_{4,3}$ para las emulsiones elaboradas con ambos concentrados a todos los pH, (Figura 63 a, b). Las emulsiones descongeladas no exhibieron

liberación de aceite y al igual que para las preparadas con los concentrados obtenidos con el ST sin ajuste de pH, el grado de desestabilización fue menor a lo reportado en emulsiones preparadas con lactosuero o con aislado proteico de soja, almacenadas en congelación bajo condiciones similares y con ausencia de agente crioprotectores (Cabezas *et al.*, 2019; Palazolo *et al.*, 2011). Las emulsiones CST50_{aj} registraron mayor incremento relativo en los valores $D_{4,3}$ a todos los pH respecto a las de CST80_{aj} (Figura 64). La mayor estabilidad para las emulsiones elaboradas con CST80_{aj}, se podría asociar a factores similares que explican la mayor estabilización de las emulsiones CST80 respecto a las preparadas con CST50 (Figura 56): el mayor %P_A y Γ (Tabla 23), que contribuiría a la formación de una membrana interfacial con mayor resistencia al estrés que ejerce la formación de cristales de hielo (Palazolo *et al.*, 2011); la presencia de polisacáridos solubles en mayor cantidad en la fase acuosa no congelada que generan un efecto estérico, disminuyendo el contacto prolongado entre las gotas durante el almacenamiento congelado y finalmente, la presencia de proteínas con mayor estado de agregación en la fase acuosa no congelada (sección 2.2.3.1).

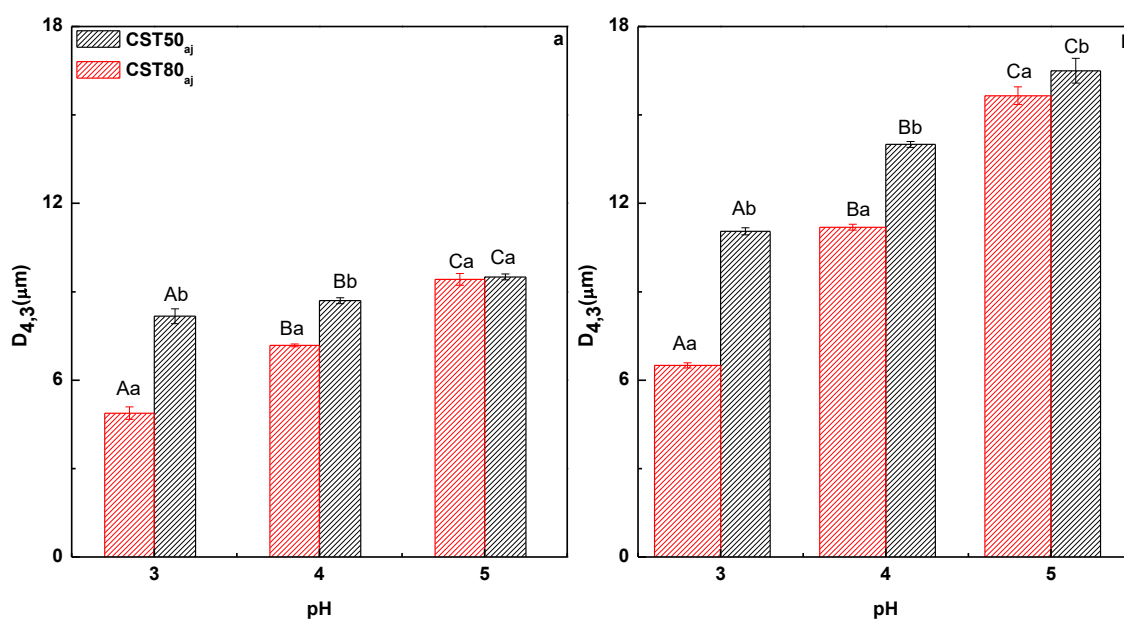


Figura 63: Diámetros promedios $D_{4,3}$ de las emulsiones CST50_{aj} y CST80_{aj}: a) iniciales y b) sometidas a congelación-descongelación. Los valores se expresaron como el promedio de tres mediciones independientes ($n = 3$) $\pm$ desvío estándar. En la parte superior de las barras, las letras mayúsculas diferentes indican que las emulsiones de una misma muestra elaboradas a diferentes pH son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher. Las letras minúsculas indican que las emulsiones elaboradas al mismo pH, pero con concentrados diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher.

Además, la variación del incremento de $D_{4,3}$ en función del pH en las emulsiones de ambos concentrados evidenció un menor porcentaje de desestabilización en las emulsiones ajustadas a pH 3,0 (Figura 64). A este pH los valores de $D_{4,3}$ y GF fueron menores (Tabla 22), lo cual contribuye a la estabilidad en estado congelado, ya que, según lo informado por otros autores, las gotas con menor diámetro se ubican con mayor eficiencia en volúmenes reducidos en la fase acuosa no congelada, reduciendo la probabilidad a sufrir ruptura de la membrana interfacial, inducida por formación de cristales de hielo (Ghosh y Coupland, 2008, Gu *et al.*, 2007, Palazolo *et al.*, 2011). Al mismo tiempo, a pH 3,0, la concentración de proteína interfacial y el $\%P_A$ fueron mayores en relación con los observados a los demás pH (Tabla 23).

De manera comparativa, luego de la congelación-descongelación, las emulsiones CST50_{aj} y CST80_{aj} exhibieron un mayor incremento en los valores $D_{4,3}$ en relación con el de las emulsiones preparadas con CST50 y CST80 en todos los pH, atribuyéndose principalmente al menor contenido de partículas con mayor tamaño en la interfase de las gotas y a la menor viscoelasticidad de los films interfaciales (Figuras 50 y 58). Las películas de menor viscoelasticidad serían menos resistentes al estrés generado durante el tratamiento de congelación-descongelación.

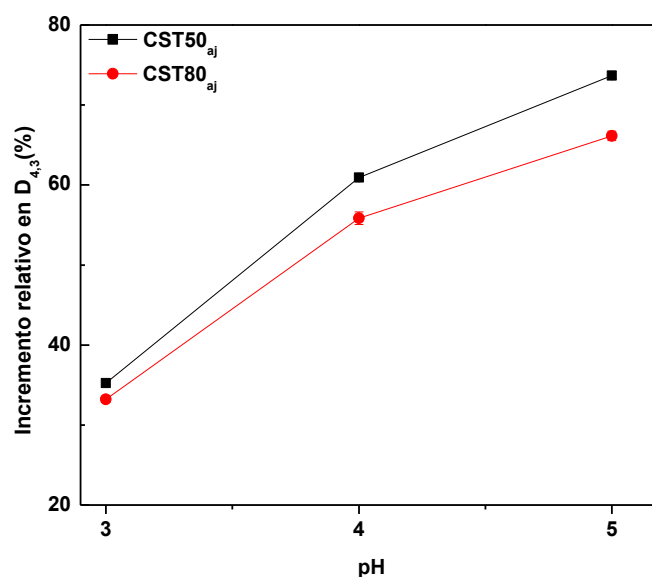


Figura 64: Incremento relativo (Ecuación 51) en los diámetros promedio $D_{4,3}$ de las emulsiones CST50_{aj} y CST80_{aj}, elaboradas en el rango de pH 3,0 a 5,0, sometidas a congelación-descongelación, respecto a las emulsiones iniciales.

2.2.3.4.2. Agitación mecánica

En la Figura 65 se muestra la variación temporal de los diámetros promedios $D_{4,3}$ de las emulsiones sometidas a trabajo mecánico en condiciones controladas durante 40 minutos. A pH 4,0 y 5,0, se observó un incremento constante y significativo de $D_{4,3}$ con el tiempo de agitación, en todas las emulsiones (Figura 65 b y c). Al final del proceso de agitación, las mismas presentaron desestabilización por separación gravitacional (cremado), asociado al considerable incremento del tamaño en las gotas. Los sistemas preparados con CST80_{aj} a pH 3,0 presentaron una alta estabilidad luego de 40 minutos de agitación, con incrementos muy leves en los diámetros $D_{4,3}$. No obstante, en las emulsiones elaboradas con CST50_{aj} se evidenció un incremento constante de este parámetro durante todo el ensayo (Figura 65a).

Como se mencionó en la sección 2.2.3.2, las condiciones de agitación no son comparables con el esfuerzo de corte del reómetro, no obstante, es probable que el esfuerzo mecánico al cual son sometidas las emulsiones disminuya considerablemente su viscosidad, por lo cual no se considera que existan diferencias sustanciales en la F_C a los distintos pH. Las dispersiones acuosas de los concentrados a los pH 4,0 y 5,0 exhibieron valores de potencial- ζ negativos, pero a pH 4,0 fue cercano a cero (Figura 44) por su cercanía al punto isoeléctrico de las proteínas de reserva y de suero de soja (Sorgentini y Wagner 1999). En este contexto, la E_C estaría altamente asociada al incremento en las interacciones asociativas (en especial, las hidrofóbicas), por la reducción en la repulsión electrostática, que aumenta la probabilidad de ruptura de las películas interfaciales durante la agitación por la colisión entre las gotas. El valor de potencial- ζ de la dispersión acuosa de CST80_{aj} a pH 3,0 fue significativamente superior al de CST50_{aj} (Figura 44) y al mismo tiempo, las emulsiones CST80_{aj} exhibieron valores menores de GF y $D_{4,3}$ (Tabla 22), por lo tanto, la E_C fue inferior. Además de lo mencionado anteriormente, la mayor estabilidad en los sistemas preparados con el concentrado obtenido a 80 °C podría relacionarse con la mayor viscoelasticidad de las películas interfaciales (Britten y Giroux, 1999; Mitidieri y Wagner, 2002; Palazolo, 2006). Esto se corroboró por medio de los ensayos de reología interfacial donde el valor de η^* fue mayor a pH 3,0 (Figura 59). El porcentaje de proteína adsorbida y Γ fueron mayores en CST80_{aj} (Tabla 23), asociado a una adsorción de agregados de gran tamaño promoviendo repulsión estérica entre las gotas. Además, la mayor presencia de polisacáridos solubles a pH 3,0 (Figura 45b), promovería una estabilización estérica en la fase continua durante la colisión. Los factores descriptos

anteriormente contribuirían a la estabilización de las emulsiones durante el tratamiento mecánico, reduciendo considerablemente la eficiencia de colisión entre las gotas.

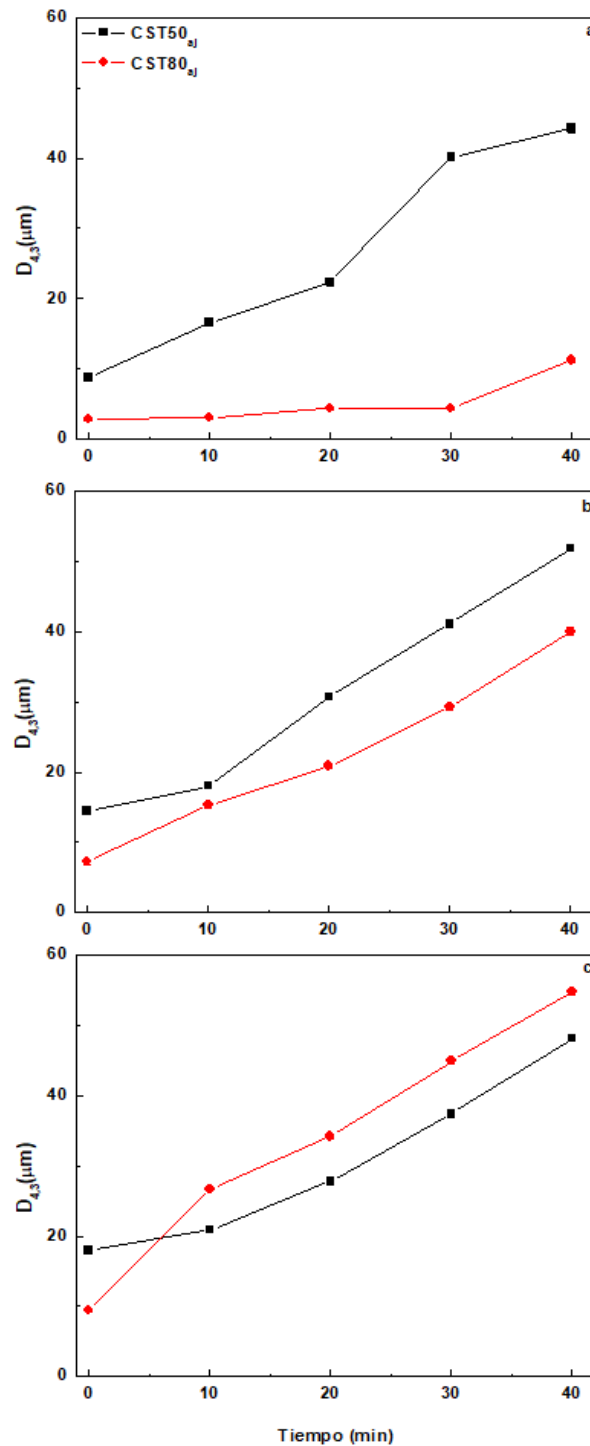


Figura 65: Efecto de la agitación orbital (275 r.p.m., 25 °C) sobre los diámetros promedio $D_{4,3}$ de emulsiones elaboradas con concentrados de suero de tofu neutralizados bajo presión reducida a 50 °C (CST50_{aj}) y 80 °C (CST80_{aj}) y ajustadas a pH entre 3,0 a 5,0. **a)** pH 3,0, **b)** pH 4,0 y **c)** pH 5,0.

Las emulsiones preparadas a pH 3,0 con los concentrados obtenidos a 80 °C a partir del ST con y sin neutralización, como se mencionó a largo de este capítulo, fueron las más estables frente a los tratamientos tecnológicos. Estos resultados están relacionados a los fenómenos descritos previamente, por lo tanto, la concentración del ST a 80 °C es una alternativa viable para obtener concentrados aplicables a emulsiones ácidas con mayor estabilidad frente a los tratamientos de estrés tecnológico.

2.2.4. Conclusiones parciales

- En las dispersiones acuosas de todos los concentrados se evidenció la presencia de partículas insolubles; el tamaño promedio de las partículas se incrementó con el aumento de la temperatura (50 a 80 °C) durante el proceso de obtención. Esto fue evidente para los concentrados obtenidos a partir del ST y del STN. A pH 4,0, debido a la cercanía al punto isoelectrico de las proteínas constituyentes, la generación de una nueva población de partículas insolubles de tamaño intermedio (entre 2,0 y 10,0 μm) redujo el diámetro promedio de las partículas. A pH 3,0, se evidenció a través de las distribuciones en superficie la existencia de partículas de gran tamaño acorde a los valores significativamente más elevados del percentil $D_{50,9}$. La presencia de estos agregados reduce la presión interfacial de las dispersiones acuosas respecto a las preparadas a pH 4,0 y 5,0, pero a su vez, incrementa la viscoelasticidad de las membranas interfaciales debido a la adsorción de las partículas insolubles.
- Los valores en los parámetros $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ se vieron incrementados significativamente en todas las emulsiones al ajustarse el pH de 3,0 a 5,0. Además, al realizar el tratamiento de sonicación previo a la medición, las DTP mostraron un desplazamiento de las modas hacia menores tamaños de partícula. Este resultado se atribuyó a la ruptura de flóculos debido al tratamiento de sonicación de baja energía. La presencia de flóculos, además, fue responsable del comportamiento pseudoplástico de todas las emulsiones. En las emulsiones formuladas con CST50 y CST50_{aj} se evidenció por medio de microscopía óptica la presencia de gotas de gran tamaño, lo cual estaría relacionado con valores más elevados de GF. A pH 3,0 los sistemas formulados con CST80 exhibieron el menor tamaño de partícula y GF, lo cual estaría relacionado con la presencia de agregados de

mayor tamaño que ingresan a la interfase reduciendo la re-coalescencia y la floculación por puenteo durante el proceso de homogeneización.

- Durante el tratamiento de congelación-descongelación las emulsiones preparadas con los concentrados obtenidos a 50 °C a partir del ST y del STN, exhibieron el mayor incremento en los diámetros $D_{4,3}$ a todos los pH respecto a las preparadas con los demás concentrados. Este resultado se relaciona con diversos factores tales como: menores valores de %P_A y Γ y la formación de membranas interfaciales con menor resistencia al estrés generado por la formación de hielo. Caso contrario ocurre con las emulsiones preparadas con los concentrados obtenidos a 65 y 80°C donde la estabilidad fue mayor, debido no sólo a la adsorción interfacial de partículas insolubles de mayor tamaño sino también al mayor contenido de polisacáridos solubles presente en la fase continua que separa las gotas, generando un efecto estérico. Cabe resaltar que las emulsiones preparadas con CST80 a pH 3,0 fueron las más estables a la congelación-descongelación, debido a los fenómenos mencionados y adicionalmente al menor tamaño promedio de partícula y GF, lo cual permite que las gotas puedan acomodarse con mayor efectividad en volúmenes reducidos en la fase acuosa no congelada, exhibiendo una menor tendencia a sufrir una ruptura por la presencia de los cristales de hielo.
- El proceso de agitación orbital en todas las emulsiones ajustadas a los pH 4,0 y 5,0 incrementó en función del tiempo de agitación los valores de los diámetros $D_{4,3}$ y provocó la desestabilización gravitacional por cremado al final del ensayo. Las emulsiones formuladas con CST80, CST80_{aj} y CST65 ajustadas a pH 3,0 exhibieron incrementos marginales en los valores $D_{4,3}$ durante el ensayo, relacionándose con varios factores que operan simultáneamente, como el menor tamaño promedio de partícula, menor GF y la carga superficial y una concentración proteica interfacial más alta que contribuye al incremento de la viscoelasticidad de la película interfacial. Además, los polisacáridos solubles generarían un efecto estérico entre las gotas en la fase continua durante un evento de colisión. Los factores mencionados promueven una mayor estabilidad de las emulsiones frente a la agitación mecánica, debido a una disminución de la eficiencia de colisión.
- En los concentrados CST50_{aj} y CST80_{aj} la neutralización del ST con NaOH previa al proceso de concentración, redujo el grado de agregación de las proteínas presentes,

debido a que el sodio debilita la unión del calcio con las proteínas y facilita su pérdida durante la diálisis, reducción en el contenido y el tamaño de los agregados afectó la capacidad emulsificante y estabilizante en los concentrados, debido a que se formaron emulsiones con mayor $D_{4,3}$, $D_{3,2}$ y GF, lo cual se corroboró de manera cualitativa por microscopía óptica. El $\%P_A$ y Γ fue menor las emulsiones elaboradas con estos concentrados, por lo tanto, las membranas interfaciales fueron más propensas a sufrir rupturas durante la formación de hielo y al estrés mecánico durante la agitación orbital. Aunque a pH 3,0 la estabilidad de las emulsiones CST80_{aj} frente a los tratamientos tecnológicos fue elevada, en términos generales, la neutralización del ST no es un tratamiento apropiado para mejorar las propiedades emulsificantes de los concentrados. Para tal fin, como variable de proceso es más importante el empleo de una temperatura elevada durante en la etapa de concentración (80 °C).

CAPÍTULO 3

Caracterización fisicoquímica y evaluación de las propiedades superficiales, espumantes y emulsificantes del concentrado del suero de soja y su complejacion con polisacárido soluble de soja para la elaboración de emulsiones o/w estables a tratamiento de estrés tecnológico.

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1. Materiales

Las hojuelas desgrasadas de soja fueron suministradas por la empresa Terminal 6 (Puerto General San Martín, Santa Fe, Argentina). Las mismas se obtuvieron por el proceso industrial Crown, que incluyen un acondicionamiento de los granos de soja y posterior quebrado-descascarado, laminado y tratamiento con *n*-hexano. Para obtener la harina de soja desgrasada (HSD), las hojuelas se molieron en un molino de cuchillas (Chincan FW Model; China) durante 1 min para evitar la generación excesiva de calor por fricción; la harina resultante se tamizó empleando un tamiz certificado de 0,500 mm de apertura de poro (N° 35, ASTM E-11-81; Zonytest, Buenos Aires, Argentina) y se guardó en frascos herméticamente cerrados hasta el momento de su uso. En la HSD, el KTI está activo, acorde con una elevada actividad antitriptica y ureásica; esta observación fue además corroborada por ensayos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Sobral *et al.*, 2012). La composición química de la HSD (% P/P) en base seca es: Proteína cruda (N×6,25), 55,0; fibra dietaria total, 33,9; cenizas 7,7 y lípidos 1,9.

El polisacárido soluble de soja (SSPS, Soyafibe-S-CA100), fue donado por Fuji Oil Co. Ltd. (Osaka, Japón). La composición química informada por el proveedor (% P/P) fue: fibra dietaria total 75,1; proteína cruda (N×6,25), 7,8; humedad, 5,8; cenizas totales; 7,8. Además, el análisis de los monosacáridos componentes de la fibra dietaria (% P/P sobre polisacáridos totales) fue: ramnosa, 5,0; fucosa, 3,2; arabinosa, 22,6; xilosa, 3,7; galactosa, 46,1; glucosa, 1,2; ácido galacturónico, 18,2 (Cabezas *et al.*, 2019).

La albúmina sérica bovina (BSA, 99% de pureza y libre de ácidos grasos), el o-ftalaldehído (OPA), la N-acetilcisteína (NAC), los reactivos y marcadores de peso molecular para electroforesis (sección 3.1.12) fueron adquiridos a Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, E.E.U.U). Todos los demás reactivos de grado analítico se adquirieron a Anedra (Research AG; Buenos Aires, Argentina) y Cicarelli Laboratorios (Reagents S.A.; San Lorenzo, Santa Fe, Argentina).

3.1.2. Preparación del suero de soja

El suero de soja (SS) se obtuvo como subproducto líquido resultante del procedimiento clásico de preparación de aislados proteicos de soja descrito por Sorgentini y Wagner (1999). En primer lugar, se preparó una dispersión de HDS en agua destilada (relación HDS/agua 1:10 P/V) por agitación magnética y el pH se ajustó a 8,0 con NaOH 0,1 M. La dispersión se agitó durante 2 h para permitir la completa hidratación de los componentes. Luego, se centrifugó a 10.000×g durante 20 min a 4 °C (centrifuga Avanti modelo J-26 XP, Beckman Coulter, Inc; California, EE.UU.) y se descartó el sedimento. Las proteínas de reserva se precipitaron, ajustando el pH del sobrenadante a 4,5 con HCl 1,0 M; el ajuste con la solución ácida se realizó periódicamente durante 2 h para mantener el pH en el valor indicado. Finalmente, el precipitado de las proteínas de reserva se separó por centrifugación a 10.000×g durante 20 min a 4 °C (centrifuga Avanti modelo J-26 XP, Beckman Coulter, Inc; California, EE.UU.). El SS, el sobrenadante resultante de esta centrifugación, se almacenó en una cámara refrigerada a $4,0 \pm 0,1$ °C (con agregado de NaN_3 , 0,03% P/V como agente antimicrobiano) hasta el momento de su procesamiento y caracterización.

3.1.3. Preparación de los concentrados del suero de soja

El SS se concentró empleando un evaporador rotatorio (Heidolph OB Lavorota 4000, Heidolph, Instruments, GmbH & Co.KG; Schwabach, Alemania) en volúmenes de 1 L por proceso, a $80,0 \pm 2,0$ °C y con una presión de 24,0 kPa. El volumen inicial del SS se redujo hasta un 80% durante la etapa de concentración y el tiempo por proceso aproximado fue de 120 min. Este proceso se repitió hasta procesar 5 L de SS. Los sueros concentrados resultantes se dializaron frente a agua destilada durante 48 h y a 4 °C con 3 intercambios de agua diarios, empleando una membrana de diálisis con un *cut off* de 3,5 kDa (Snake Skin, Thermo Scientific; Rockford, Illinois, EE. UU.). Los líquidos dializados obtenidos se agruparon y finalmente se liofilizaron (-45 °C, 2,0 Pa, 85 h, liofilizador LI-2E260, Rificor SA; Buenos Aires, Argentina). (3,5 kDa, Snake Skin, Thermo Scientific; Rockford, IL, EE. UU.), obteniendo el concentrado de suero de soja (CSS).

El rendimiento porcentual (R, % P/P) en la obtención del CSS, se calculó mediante la ecuación 26 (sección 1.1.2).

3.1.4. Determinación de densidad

La densidad del SS y las dispersiones acuosas del CSS se determinó a 25 °C empleando un picnómetro de 50 mL provisto de un capilar. El procedimiento experimental y el cálculo de la densidad fueron los mismos que los descriptos en la sección 1.1.3. Los valores obtenidos de la densidad se utilizaron para la conversión de los parámetros de composición química de % P/P a g/L.

3.1.5. Determinación de extracto seco

El extracto seco del SS (Sección 3.1.2) se determinó por el método gravimétrico de secado en estufa a presión atmosférica normal. La determinación y el cálculo de extracto seco (ES, % P/P) se realizó siguiendo las condiciones experimentales descriptas previamente (sección 1.1.4)

3.1.6. Determinación de cenizas

El contenido de cenizas del SS y del CSS se determinó por el método gravimétrico tradicional de calcinación por vía seca. Se pesó 500 mg de muestra en un crisol de porcelana y la calcinación se inició por calentamiento suave hasta residuos carbonosos. Luego, el tratamiento oxidativo se completó en una mufla convencional a 550 ± 10 °C durante 24 h. Las cenizas se enfriaron hasta temperatura ambiente en un desecador de vacío provisto con sílica gel activa. El porcentaje de cenizas (% P/P) se calculó empleando la ecuación 29 (sección 1.1.5).

3.1.7. Determinación del contenido de calcio total

El contenido de calcio total en el SS y en el CSS se determinó empleando las cenizas obtenidas según el procedimiento experimental descripto en la sección 3.1.6. Las cenizas obtenidas se disolvieron en 10,0 mL de HCl 0,2 M. Sobre las soluciones ácidas resultantes, diluidas en agua bidestilada (1:50 V/V), se determinó el contenido de calcio por el método espectrofotométrico (*o*-cresoltaleína complexona) (Morin, 1974), empleando un kit comercial (Ca-Color AA, Wiener Lab.; Rosario, Argentina) (sección 1.1.6). Los procedimientos de

calibración se realizaron empleando las soluciones estándar de calcio incluidas en el *kit* comercial, de acuerdo con las instrucciones dadas por el proveedor. Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado y el contenido de calcio total se expresó en % P/P sobre la muestra.

3.1.8. Determinación de nitrógeno total y proteína bruta

3.1.8.1. Método de Kjeldahl

El contenido de proteína bruta del SS y del CSS se determinó por el método de Kjeldahl ($N \times 6,25$) (método 920.87, AOAC, 1997). Siguiendo el procedimiento experimental descrito en sección 1.7.1, se pesó 0,5 g de muestra para la etapa de digestión, empleando un balón Kjeldahl de 500 mL con la adición de 11 g de la mezcla catalizadora ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$ y K_2SO_4 en una relación 10:1 P/P) y 20 mL de H_2SO_4 concentrado (98% P/P , $\delta = 1,84$ g/mL). Al finalizar la etapa de digestión, a la solución ácida previamente enfriada a temperatura ambiente, se agregó 200 mL de agua destilada y el balón se transfirió a la unidad de destilación, donde se agregó NaOH 40% P/P hasta alcalinidad neta. El NH_3 liberado y destilado por arrastre de vapor de agua se recolectó en 50 mL de ácido bórico (H_3BO_3) 4,0% P/V conteniendo gotas de indicador combinado (rojo de metilo 0,016% P/V y verde de bromocresol 0,083% P/V en etanol). La valoración se realizó con solución estandarizada de H_2SO_4 0,1 N hasta viraje del indicador. Paralelamente se realizó un ensayo blanco en ausencia de la muestra.

Los contenidos de nitrógeno total y de proteína bruta se calcularon empleando las ecuaciones descriptas en la sección 1.1.7.1

3.1.8.2. Método de micro-Kjeldahl con colorimetría final

El método de micro-Kjeldahl con colorimetría final se utilizó como método alternativo para la determinación del contenido de nitrógeno total y proteína bruta en el CSS. Para la digestión se pesó entre 10 y 20 mg de muestra, y se colocó en un balón Kjeldahl de 100 mL junto con 0,11 g de la mezcla catalizadora ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$, K_2SO_4 y TiO_2 en proporción másica 100:3:5, respectivamente) y 3,0 mL de H_2SO_4 concentrado (98% P/P , $\delta = 1,84$ g/mL). Al finalizar la digestión, se adicionó agua destilada a la solución ácida previamente enfriada temperatura

ambiente; luego, el contenido del balón se transfirió cuantitativamente a un matraz aforado de 100 mL, llevando a volumen final con agua destilada. Este procedimiento se repitió para la obtención de la solución del blanco, en ausencia de la muestra y la solución madre de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($[\text{N}] = 100 \mu\text{g/mL}$), la cual se diluyó para obtener distintos estándares en un rango de $[\text{N}]$ de 2–25 $\mu\text{g/mL}$ (sección 1.1.7.2).

Para llevar a cabo la reacción colorimétrica, se utilizaron las soluciones A, B, C y D (sección 1.1.7.2). Se mezcló 0,5 mL del digestato (muestra, patrón o blanco) con 1,5 mL de buffer de trabajo (mezcla 1:1 V/V de reactivos A y B). Luego se agregó 0,4 mL de reactivo C, se agitó en un vórtex y se incubó en baño termostático a 25 °C durante 10 min. Finalmente, se agregó 0,2 mL de reactivo D, se agitó y se dejó reaccionar durante 30 min, incubando la mezcla en un baño termostático a 25 °C. La mezcla resultante se diluyó con 10 mL de agua destilada y se midió la absorbancia a 660 nm (Abs_{660}) empleando un espectrofotómetro UV-visible T60 (PG Instruments; Leicestershire, Reino Unido). La recta de calibración se realizó empleando las soluciones estándares de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 21). El contenido de nitrógeno total y de proteína bruta se calculó por medio de las ecuaciones 30 y 31 (sección 1.1.7.2).

3.1.9. Determinación del contenido de carbohidratos totales

El contenido de carbohidratos totales en el SS y el CSS se determinó por el método de fenol-ácido sulfúrico (método 988.12, AOAC, 1997), usando glucosa de calidad HPLC como patrón. Se preparó una solución patrón 0,1 % P/V ($[\text{Glu}] = 1000 \mu\text{g/mL}$) en agua bidestilada y a partir de la misma, diluciones en un rango de $[\text{Glu}]$ entre 10 y 70 $\mu\text{g/mL}$. Como blanco se empleó agua bidestilada. Para el SS de partida se tomó 1,0 mL y se realizó una dilución 1/200 V/V con agua bidestilada. Para el CSS, en cambio, se preparó una dispersión acuosa (0,1 % P/P) con agua bidestilada por agitación magnética suave durante 2 h; seguidamente se realizó una dilución 1/20 V/V con agua bidestilada previo al análisis.

Como se detalló anteriormente (sección 1.1.8), en tubos de ensayos de vidrio, se colocaron 1,0 mL de agua bidestilada (blanco) o de las soluciones (patrón, muestra) y 0,5 mL de fenol 5,0% P/V , incubando las mezclas durante 10 min a temperatura ambiente. Luego, se agregó 2,5 mL de H_2SO_4 concentrado (98% P/P , $\delta = 1,84 \text{ g/mL}$) a cada tubo; la mezcla resultante se agitó en un vórtex y se incubó a 37 °C en un baño termostático durante 20 min. Finalmente, se midió la absorbancia a 480 nm (Abs_{480}) empleando un espectrofotómetro UV-visible T-60 (PG Instruments; Leicestershire, Reino Unido). La recta de calibración se realizó empleando las

soluciones estándares de glucosa (Figura 22). El cálculo del porcentaje de hidratos de carbono totales se realizó empleando las ecuaciones 32 y 33

3.1.10. Determinación de fibra dietaria total

La determinación del contenido de fibra dietaria total se realizó como servicio técnico en la Cátedra de Nutrición y Bromatología (Facultad de Bioquímica y Farmacia, Universidad de Buenos Aires), empleando el método gravimétrico-enzimático oficial de la AOAC (985.29; AOAC, 1997) (sección 1.1.9). El contenido de fibra dietaria total se expresó como porcentaje (P/P) sobre la muestra inicial.

3.1.11. Determinación del contenido de lisina total y reactiva

3.11.1.1. Lisina total

Este análisis fue realizado como servicio técnico por el Laboratorio Dr. Rapela (Buenos Aires, Argentina), empleando el método oficial AOAC 994.12 (AOAC, 1997), que consistió en la determinación de aminoácidos por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). El procedimiento se realizó como se detalló previamente (Sección 1.1.10.1). El contenido de lisina total (LT) de los concentrados se expresó en % P/P sobre proteína total (equivalente a g/16 g N), teniendo en cuenta sus contenidos de proteína bruta (secciones 3.1.8.1 y 3.1.8.2).

3.1.11.2. Lisina reactiva

El contenido de lisina reactiva (LR) se determinó utilizando el método espectrofotométrico descrito previamente en la sección 1.1.10.2. En un vaso de precipitado, se pesó 20 mg de muestra y se agregó buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,0 con SDS 1,0% P/V , hasta alcanzar una masa final de 25 g. Las muestras se dispersaron por agitación magnética suave durante 2 h y las dispersiones resultantes se trataron a 100 °C en un baño en ebullición durante 30 min para solubilizar completamente las proteínas. Seguidamente se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 800×g durante 15 min a 20 °C (centrifuga Rolco CM 4080

(Millenium; Buenos Aires, Argentina) (Ingrassia et al., 2017). Los *pellets* se descartaron y los sobrenadantes se emplearon para la determinación de LR.

Se empleó como patrón clorhidrato de L-lisina (Lis), secado previamente (105 °C, 3 h). Se preparó una solución patrón 8 mM del aminoácido en buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,0 con SDS 1,0% P/V y se realizaron diluciones de la solución madre con el mismo buffer en un rango entre 0,0008 y 0,0032 mili moles de Lis para obtener la recta de calibración (Figura 23).

La preparación del reactivo OPA–NAC se realizó como se detalló en la sección 1.1.10.2. Para realizar la determinación espectrofotométrica se añadieron 10 mL del reactivo OPA-NAC a la solución de 25 mL del sobrenadante de la preparación de las muestras o de las soluciones estándar de clorhidrato de L-lisina. La absorbancia se midió a 335 nm (Abs_{335}) empleando el espectrofotómetro UV-visible T-60 (PG Instruments; Leicestershire, Reino Unido). El cálculo del contenido de LR se realizó empleando las ecuaciones 35 y 36.

3.1.11.3. Lisina no reactiva

A partir del contenido de lisina total (LT) y de lisina reactiva (LR), determinados por los procedimientos descritos en las secciones anteriores, se calculó el contenido de lisina no reactiva (LNR, % P/P sobre lisina total) empleando la ecuación 37 (sección 1.1.10.3).

3.1.12. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con tricina (TSDS-PAGE)

La composición polipeptídica del CSS se evaluó por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y en presencia de tricina (TSDS-PAGE) de acuerdo con el método descrito por (Schägger y von Jagow, 1987). Los geles se obtuvieron en condiciones reductoras y no reductoras, empleando un equipo Bio-Rad Miniprotean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories Inc., EE. UU.). Las proteínas son puestas en contacto con un agente tensoactivo como el SDS, el cual promueve la desnaturalización y formación de complejos de carga neta negativa con las proteínas. Debido a que los complejos SDS/proteína exhiben una relación similar carga/masa, el proceso de separación en el gel está determinado por la diferencia en el peso molecular de los polipéptidos.

Los reactivos empleados, la preparación de la muestra y de los geles y las condiciones de corrida, revelado y análisis de los geles se detallaron en las secciones 1.1.11.1 a 1.11.1.4.

3.1.13. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR)

Los ensayos de FTIR se realizaron dispersando la muestra en agua destilada (0,1 % p/p) por agitación magnética durante 2 h. Luego, se colocó 0,1 mL de dispersión en el dispositivo ATR hasta cubrir completamente el cristal de seleniuro de zinc (ZnSe) y posteriormente se secó suavemente con aire tibio hasta alcanzar la deshidratación completa. Se empleó un espectrómetro Shimadzu modelo IR Affinity-1 (Shimadzu Scientific Instruments; Maryland, EE. UU.) y los espectros se obtuvieron en un rango de $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$. Las condiciones de medición y el procesamiento de los espectros se describieron en la sección 1.1.12.

3.1.14. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los termogramas del concentrado de suero de soja fueron obtenidos utilizando un equipo de calorimetría diferencia de barrido modulado (MDSC) modelo Q-200 (TA Instruments, LLC Waters; New Castle, EE.UU.). Se colocó entre 9-11 mg de muestra en capsulas hermética estándar de aluminio empleando una micropipeta automática, posteriormente las cápsulas fueron selladas herméticamente. Los ensayos fueron realizados empleando una rampa de calentamiento de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ en un rango de temperatura de $20\text{--}150^{\circ}\text{C}$, utilizando una cápsula de aluminio vacía como referencia. En los termogramas obtenidos se determinó la entalpía parcial de cada transición y la entalpía total de desnaturalización proteica (ΔH_d). Los valores de ΔH_d parciales y totales se expresaron en J/g proteína seca, para lo cual se tuvo en cuenta el contenido proteico de las muestras.

3.1.15. Análisis termogravimétrico (TGA)

Los ensayos de TGA se realizaron empleando una termobalanza modulada TGA-Q500 (TA Instruments, LLC Waters; New Castle, EE.UU.). Se pesó 5 –10 mg de muestra y se calentó a $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ bajo una atmósfera de nitrógeno (caudal = $40\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) y en un rango de temperatura $20\text{--}700^{\circ}\text{C}$. El equipo registró la variación porcentual de la pérdida de masa en función de la temperatura y al igual que en los concentrados del suero de tofu (sección 1.1.13), se definieron tres zonas de degradación en función de la temperatura de inicio y final de los picos y fin de pico. Para cada zona, se determinaron la temperatura de pico (T_p) y la pérdida parcial de masa (Δm , %).

3.1.16. Dependencia de la turbidez de las dispersiones con el pH

Para evaluar la dependencia de la turbidez con el pH, se prepararon dispersiones acuosas (0,1% P/P) de CSS mediante agitación magnética suave durante 3 h en agua destilada, en urea 6,0 M y en solución de urea 6,0 M con ditioneitol (DTT) 30 mM (Zhu *et al.*, 2017). Las curvas de turbidez en función del pH se obtuvieron agregando alícuotas sucesivas de HCl 0,1 M a las dispersiones (20 mL) bajo agitación magnética suave y constante. Luego del agregado de cada alícuota del ácido se registró el valor del pH e inmediatamente después se determinó la turbidez por medida de la absorbancia a 600 nm (espectrofotómetro UV-visible T60, PG Instruments; Leicestershire, Reino Unido).

3.1.17. Dependencia del potencial- ζ con el pH

La determinación del potencial- ζ en la muestra se realizó en condiciones similares a las descritas en la sección 1.1.15. El pH de las dispersiones acuosas (0,1% P/P en agua bidestilada) se ajustó en un rango de 2,0 a 7,0 empleando soluciones de HCl 0,1 M o NaOH 0,1 M. Luego, las dispersiones se filtraron empleando un papel filtro de celulosa cualitativo Whatman N° 1. Las dispersiones filtradas se colocaron en celdas capilares (modelo DTS1070) (Figura 24) y el potencial- ζ se midió a 25 °C usando un analizador Malvern Zetasizer ZSP ZEN 5600 (Malvern Panalytical Ltd; Worcestershire, Reino Unido) a un ángulo fijo de 173°. Las determinaciones se realizaron por triplicado de tres dispersiones preparadas en forma independiente y con 20 lecturas por réplica.

3.1.18. Dependencia de la solubilidad de proteínas e hidratos de carbono con el pH

El CSS se dispersó en agua destilada (0,1% P/P) por agitación magnética suave durante 2 h y el pH se ajustó siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente (sección 3.1.16). Luego, las dispersiones se centrifugaron a 10.000×g durante 20 minutos a 20 °C (centrífuga Hermle 129 Z200 M/H; Wehningen, Alemania) y se descartó el sedimento. El contenido de proteína y carbohidratos totales se determinaron tanto en los sobrenadantes como en las dispersiones acuosas iniciales realizando diluciones adecuadas. El contenido de proteínas se determinó usando el método espectrofotométrico de Lowry modificado usando BSA como proteína estándar (Markwell *et al.*, 1978) (sección 1.1.16) y el de hidratos de carbono totales, por el método de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1951) siguiendo el procedimiento experimental

descripto en la sección 1.1.8. Los cálculos de S_P y S_{HC} se realizaron empleando las ecuaciones 40 y 41.

3.1.19. Propiedades superficiales en interfase agua/aire

3.1.19.1. Determinación de la tensión superficial

La tensión superficial en la interfase aire/agua se midió en un tensiómetro automatizado Lauda TD3 LMT 850 (Lauda Königshofen; Alemania) asociado a una unidad termostática Peltier, siguiendo el procedimiento experimental descripto en la en la sección 1.1.17.1. Se prepararon dispersiones acuosas (0.25% de proteína P/P) ajustadas en un rango de pH de 2,0 a 7,0 con solución de HCl o NaOH 1,0 M. La tensión superficial se midió a 25 °C cada minuto y las medidas se optimizaron en el tiempo hasta llegar al valor de equilibrio ($\gamma_{s,D}$). El proceso se repitió con agua destilada ajustada al mismo pH que la dispersión ($\gamma_{s,A}$). La presión superficial de equilibrio (π_s) se calculó empleando la ecuación 42 (sección 1.1.17.1)

3.1.19.2. Evaluación de la reología superficial

Los ensayos de reología superficial en la interfase aire/agua se realizaron en un reómetro oscilatorio AR-G2 (TA Instruments, Waters LLC; Newcastle, DE, EE. UU.), equipado con un anillo de Du Noüy. Se prepararon dispersiones acuosas (1,0% de proteína P/P) en el rango de pH de 2,0 a 7,0 y las mediciones se llevaron a cabo por el procedimiento descripto previamente (sección 1.1.17.2). Los ensayos interfaciales se realizaron a una temperatura de 25°C, a una frecuencia constante de 0,3 Hz y una deformación ajustada al 3,0%, dentro del rango viscoelástico lineal. El *gap* se fijó en 9000 μm en todas las mediciones para asegurar la reproducibilidad. Se monitoreó la evolución de las propiedades reológicas de la interfase mediante la variación de la viscosidad compleja (η^*) frente al tiempo (Baldursdottir et al., 2010). η^* se calculó empleando la ecuación 43 (sección 1.1.17.2).

3.1.20. Evaluación de las propiedades espumantes

Como se detalló previamente en la sección 1.1.18, los ensayos de formación de espuma se realizaron en un tubo graduado de 10 mL incorporando aire con una aguja (caudal de 40 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$) a través de 1,5 mL de dispersión acuosa 1,0% de proteína P/P (Figura 27). El pH de las

dispersiones se ajustó en un rango de 2,0 a 7,0 con HCl 0,1 M o NaOH 1,0 M. Se determinó el Overrun % midiendo el volumen de espuma (V_e , en ml) generado durante 1 minuto de burbujeo y se calculó empleando la ecuación 44. Como parámetro de estabilidad se determinó el tiempo ($t_{1/2}$, s) en que el volumen de la espuma alcanza la mitad de su valor inicial ($V_e/2$) luego de detener el burbujeo.

3.1.21. Caracterización fisicoquímica de dispersiones acuosas de concentrado de suero de soja para la preparación emulsiones o/w

3.1.21.1. Distribución de tamaño de partícula por dispersión estática de luz (SLS, *Static Light Scattering*)

Se prepararon dispersiones acuosas (0,1% P/P) por agitación magnética suave durante 2 h. El pH de las dispersiones (500 mL) se ajustó a pH 3,0, 4,0 y 5,0 con HCl 1,0 M bajo agitación magnética constante, adicionando alícuotas de HCl 1,0 M. Las medidas de DTP se realizaron empleando un analizador Malvern Mastersizer 2000–E (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido) asociado a una unidad de dispersión por vía húmeda (Hydro 2000 MU). La velocidad del émbolo agitador en la unidad dispersora fue de 1000 rpm y los parámetros ópticos seleccionados para la conversión del patrón angular de dispersión de luz en la correspondiente DTP fueron: índice de refracción del dispersante: 1,33, índice de refracción de la fase dispersa: 1,52 y coeficiente de absorción: 0,1. A partir de las DTP se obtuvieron los diámetros promedios de Sauter ($D_{3,2}$) y de De Brouckere ($D_{4,3}$) (ecuaciones 45 y 46, sección 2.1.1.1).

3.1.21.2. Determinación de la tensión interfacial

La tensión interfacial en la interfase aceite/agua se midió a 25 °C usando un tensiómetro automatizado Lauda TD3 LMT 850 (Lauda Königshofen, Alemania). Las mediciones se realizaron empleando un anillo de Du Noüy, el cual fue convenientemente preparado para la eliminación de impurezas (sección 1.11.17.1). Las medidas de tensión interfacial se realizaron en las condiciones descriptas en la sección 2.1.1.2. Se prepararon dispersiones acuosas en buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,0 (0,25 % de proteína P/P) y el pH se ajustó a 3,0, 4,0 o 5,0 con HCl 1,0 M. A partir del valor de la tensión interfacial de equilibrio de la dispersión ($\gamma_{i,D}$) y la del

agua ajustada al mismo pH de la dispersión, se calculó la presión interfacial (π_i) empleando la ecuación 47.

3.1.21.4. Evaluación de la reología interfacial

Las propiedades reológicas en la interfase aceite/agua se evaluaron en dispersiones acuosas (1,0% de proteína P/P) a pH 3,0, 4,0 y 5,0. Se empleó un reómetro oscilatorio AR-G2 (TA Instruments, Waters LLC; Newcastle, DE, EE. UU.), asociado a un anillo de Du Noüy (Figura 46). Los ensayos se realizaron en el rango de viscoelasticidad lineal a una frecuencia constante de 0,3 Hz, una deformación fija del 3,0% y un *gap* de 9000 μm (sección 2.1.1.4). El seguimiento de las propiedades reológicas de las películas interfaciales se realizó mediante la variación de la viscosidad compleja interfacial (η^*) en función del tiempo. η^* se calculó empleando la ecuación 43 (sección 1.11.17.2) (Baldursdottir *et al.*, 2010).

3.1.22. Preparación de emulsiones o/w

Las emulsiones se prepararon empleando un proceso de homogeneización de dos etapas consecutivas:

I) Homogeneización primaria: Se prepararon pre-emulsiones o emulsiones groseras por homogeneización de 15 g de dispersiones acuosas (1,0% proteína P/P en buffer fosfato de sodio 10 mM, ajustadas a pH entre 3,0 a 5,0 con HCl 1,0 M) con 5 g de aceite refinado de girasol (Molino Cañuelas, Cañuelas, Argentina) en un recipiente de policloruro de vinilo (PVC) de 30 mm de diámetro interno. Se empleó un homogeneizador de alta velocidad rotor/estator Ultraturrax T-25 usando la punta de dispersión S25N-8G (IKA Labortechnik, Staufen, Alemania). La homogeneización se llevó a cabo durante 1 min a 20.000 rpm.

II) Homogeneización secundaria: Las emulsiones finales se obtuvieron por sonicación de las pre-emulsiones empleando un homogeneizador ultrasónico de alta intensidad Sonic Vibracell 750VCX (Sonic & Materials Inc.; Newtown, EE. UU.). La sonicación se llevó a cabo con un tiempo efectivo de 3 min (con secuencias *on/off* de 20 s), operando a 20 kHz y 40% de amplitud. Durante la homogeneización ultrasónica, el recipiente se introdujo en un baño de agua-hielo para permitir la disipación eficiente del calor generado durante la misma. Las emulsiones

finales fueron inmediatamente caracterizadas y/o sometidas a los distintos tratamientos tecnológicos (secciones 3.1.22 y 3.1.23).

3.1.23. Tratamiento de estrés tecnológico sobre las emulsiones o/w

3.1.23.1. Congelación/descongelación

Las emulsiones recién preparadas (10 mL) se transfirieron a recipientes verticales de PVC con tapa plástica y 30 mm de diámetro interno y se almacenaron durante 24 h en un freezer convencional a -18 ± 2 °C. Finalmente, las emulsiones se descongelaron en un baño de agua a 30 ± 2 °C durante 1 h y fueron inmediatamente caracterizadas (sección 3.1.23).

3.1.23.2. Agitación mecánica controlada

Para llevar a cabo el tratamiento de agitación mecánica controlada, las emulsiones (20 mL) se transfirieron a recipientes verticales de PVC y 30 mm de diámetro interno. Luego, las emulsiones se colocaron en una cabina de agitación orbital (Ferca TT400; Ferca Equipamientos, Buenos Aires, Argentina). El tratamiento se realizó sometiendo las emulsiones a un esfuerzo de corte mecánico a 275 rpm durante 40 min, tomando alícuotas de 1 mL cada 10 min con el objetivo de monitorear la desestabilización de las emulsiones por medio de las técnicas de caracterización descriptas en la sección 3.1.23.

3.1.24. Ensayos de caracterización de las emulsiones

3.1.24.1. Distribución de tamaño de partícula

La DTP de las emulsiones se determinó por dispersión estática de luz empleando un analizador de tamaño de partícula Malvern Mastersizer modelo 2000-E (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido) asociado a una unidad de dispersión por vía húmeda (Hydro 2000 MU). Las medidas se realizaron usando agua como dispersante y la velocidad del émbolo agitador en la unidad dispersora fue de 2000 rpm. Para llevar a cabo las mediciones, las emulsiones iniciales o sometidas a distintos tratamientos (secciones 3.1.22.1 y 3.1.22.2) se diluyeron en el dispersante hasta alcanzar un nivel de turbidez adecuado. Los parámetros ópticos empleados para la conversión del patrón angular de dispersión de luz en la DTP fueron: índice

de refracción del dispersante: 1,33, índice de refracción de la fase dispersa (aceite de girasol): 1,47 y coeficiente de absorción: 0,001 Para evaluar el grado de floculación de las emulsiones, antes de realizar las medidas, las emulsiones diluidas en el dispersante se sometieron a una sonicación de baja energía (40 W, 1 min) empleando la punta ultrasónica asociada a la unidad de dispersión (Higashitani *et al.*, 1993; Porfiri *et al.*, 2016). A partir de las DTP de las emulsiones sin y con tratamiento previo de sonicación, se obtuvieron los diámetros promedios de Sauter ($D_{3,2}$) y de De Brouckere ($D_{4,3}$). Finalmente, el grado de floculación (GF) se calculó empleando la ecuación 48.

3.1.24.2. Comportamiento de flujo

El comportamiento de flujo de las emulsiones iniciales se realizó empleando un reómetro AR-G2 (TA Instruments, Waters LLC; Newcastle, DE, EE. UU) asociado a una geometría cono-plato (diámetro 40 mm y ángulo 2°; $gap = 1000 \mu m$). Los ensayos se realizaron a una velocidad de deformación entre 0,01 a 200 s^{-1} y a una temperatura de $25 \pm 1^{\circ}C$, controlada mediante un baño termostatzado (Julabo ACW100, Julabo Labortechnik; Seelbach, Alemania) adaptado al reómetro. Antes del inicio de los ensayos, todas las emulsiones se dejaron en reposo durante 2 min para equilibrar la temperatura. Las determinaciones se realizaron por triplicado y las curvas de flujo se ajustaron al modelo reológico de la Ley de Potencia (ecuación 49).

3.1.24.3. Evaluación de la microestructura

Para evaluar la microestructura de las emulsiones, se tomaron alícuotas de 10 μL de emulsión y posteriormente se diluyeron en proporción 1:10 (V/V) con agua destilada ajustada al mismo pH de las emulsiones (3,0, 4,0 o 5,0). Las emulsiones diluidas se colocaron en un portaobjetos (75 mm $\times$ 25 mm) y se cubrieron cuidadosamente con un cubreobjeto (22 mm $\times$ 22 mm). Las observaciones se realizaron empleando un lector multimodal de imagen Cytation 5 (BioTek Instruments, Inc.; Winooski, VT, EE. UU.), con un aumento de 100 $\times$ y 200 $\times$. Las imágenes se procesaron con software Gen 5 (R) asociado al equipo.

3.1.25. Caracterización fisicoquímica de dispersiones mixtas de concentrado de suero de soja (CSS) y polisacárido soluble de soja (SSPS) para la preparación de emulsiones o/w

3.1.25.1. Dependencia de la turbidez de las dispersiones con el pH

En primer lugar, se prepararon dispersiones acuosas (0,1% P/P) de CST, SSPS y CSS/SSPS (relación másica 1/1) por agitación magnética durante 3 h en agua destilada, en urea 6,0 M y en solución de urea 6,0 M con ditioneitol (DTT) 30 mM (sección 1.1.14) (Zhu *et al.*, 2017). Para obtener las curvas de turbidez en función del pH se agregaron alícuotas sucesivas de HCl 0,1 M a las dispersiones (20 mL) bajo agitación magnética suave y constante. Luego del agregado de cada alícuota del ácido se registró el valor del pH e inmediatamente después se determinó la turbidez por medida de la absorbancia a 600 nm (espectrofotómetro UV-visible T60, PG Instruments; Leicestershire, Reino Unido).

3.1.25.2. Distribución de tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*)

La técnica de dispersión dinámica de luz 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. Para obtener la distribución de tamaño de partícula (DTP), Se prepararon dispersiones acuosas de CSS, SSPS y CSS/SSPS (relación másica $1/1$) con agua bidestilada (0,1 % P/P) por agitación magnética durante 2 h, a pH isoiónico (5,0–6,0) y a pH 3,0, ajustado con solución de HCl 1,0 M.. Seguidamente, se filtraron las dispersiones empleando un papel de filtro de celulosa cualitativo grado 1 Whatman N°1(cut off 11 μ m); las dispersiones filtradas se depositaron en celdas de acetato (modelo DTS0012). Se empleó un analizador Malvern Zetasizer ZSP ZEN 5600 (Malvern Panalytical Ltd; Worcestershire, Reino Unido). Las determinaciones se realizaron a 25 °C y los índices de refracción seleccionados de la fase dispersa y del dispersante fueron 1,52 y 1,33, respectivamente. Las determinaciones se realizaron por triplicado, con 3 lecturas sucesivas por réplica.

3.1.25.3. Determinación del potencial- ζ

El potencial- ζ de las dispersiones se determinó en dispersiones acuosas de CSS, SSPS y CSS/SSPS (relación másica 1/1) preparadas con agua bidestilada (0,1 % P/P) con agitación magnética durante 2 h. Las determinaciones se realizaron al pH isoiónico de las dispersiones (5,0–6,0) y a pH 3,0, ajustado con solución de HCl 1,0 M. Después del ajuste del pH, las dispersiones se filtraron usando un papel de filtro de celulosa Whatman N° 1. Las dispersiones filtradas se cargaron en celdas capilares (modelo DTS1070) (Figura 24, sección 1.1.15) y el potencial- ζ se midió a 25 °C usando un analizador Malvern Zetasizer ZSP ZEN 5600 (Malvern Panalytical Ltd; Worcestershire, Reino Unido) a un ángulo fijo de 173°. Las determinaciones se realizaron en tres dispersiones preparadas en forma independiente y con 20 lecturas por réplica.

3.1.26. Evaluación de propiedades interfaciales en interfase aceite/agua

3.1.26.1. Determinación de la tensión interfacial

La tensión interfacial en la interfase aceite/agua se midió a 25 °C en las mismas condiciones detalladas en la sección 3.1.20.3. Se prepararon dispersiones acuosas (0,25 % de proteína % P/P), de CSS, SSPS y CSS/SSPS (relación másica 1:1) a pH 3,0 ajustado con solución de HCl 1,0 M. Para la determinación se empleó un tensiómetro LaudaTD3 LMT 850 (Lauda Königshofen; Alemania). A partir del valor de la tensión interfacial de equilibrio de la dispersión ($\gamma_{i,D}$) y la del agua ajustada al mismo pH de la dispersión ($\gamma_{i,A}$), se calculó la presión interfacial (π_i) empleando la ecuación 47.

3.1.26.2. Evaluación de la reología interfacial

Las propiedades interfaciales en la interfase aceite/agua se evaluó en dispersiones acuosas (2,0 y 3,0 % P/P) de CSS, SSPS y CSS/SSPS (relación másica 1/1) ajustadas a pH 3,0 con solución de HCl 1,0 M. Se empleó un reómetro oscilatorio AR-G2 (TA Instruments, Waters LLC; Newcastle, DE, EE. UU.) asociado a un anillo de Du Noüy. Los ensayos se realizaron en

el rango de viscoelasticidad lineal a una frecuencia constante de 0,3 Hz, una deformación fija del 3,0% y un *gap* de 9000 μm (sección 2.1.1.4). El seguimiento de las propiedades reológicas de las películas interfaciales se realizó mediante la variación de la viscosidad compleja interfacial (η^*) en función del tiempo. η^* se calculó empleando la ecuación 43 (sección 1.11.17.2) (Baldursdottir *et al.*, 2010).

3.1.27. Preparación de emulsiones o/w a partir de dispersiones mixtas de concentrado de suero de soja y polisacárido soluble de soja

Las emulsiones o/w se prepararon a partir de dispersiones acuosas y aceite refinado de girasol (Molino Cañuelas, Cañuelas, Argentina) por medio de las siguientes estrategias:

3.1.27.1. Complejacion en fase acuosa (CFA)

Se prepararon 16,0 g de dispersiones acuosas de CSS/SSPS (relación másica 1/1) 2,0 y 3,0 % P/P ajustadas a pH 3,0 con solución de HCl 1,0 M, por agitación magnética durante 2 h. Además, como controles se prepararon dispersiones de CSS y de SSPS 2,0 y 3,0% P/P al mismo pH. El proceso de homogeneización se realizó en dos etapas consecutivas:

I) Homogeneización primaria: Las pre-emulsiones o emulsiones groseras se prepararon por homogeneización de 16,0 g de dispersiones acuosas y 4,0 g de aceite refinado de girasol ($\phi_m = 0,2$) en un recipiente de policloruro de vinilo (PVC) de 30 mm de diámetro interno. Se empleó un homogeneizador de alta velocidad rotor/estator Ultraturrax T-25 usando la punta de dispersión S25N-8G (IKA Labortechnik, Staufen, Alemania). La homogeneización se llevó a cabo durante 1 min a 20.000 rpm.

II) Homogeneización secundaria: Las pre-emulsiones se sonicaron empleando un homogeneizador ultrasónico de alta intensidad Sonic Vibracell 750VCX (Sonic & Materials Inc.; Newtown, EE. UU.). La sonicación se llevó a cabo con un tiempo efectivo de 3 min (con secuencias *on/off* de 20 s), operando a 20 kHz y 40% de amplitud. Durante la homogeneización ultrasónica, el recipiente se introdujo en un baño de agua-hielo para permitir la disipación eficiente del calor generado durante la misma. Las emulsiones obtenidas se diluyeron con 20,0

g de agua destilada ajustada a pH 3,0 para obtener las emulsiones finales con una fracción másica de fase dispersa de 0,1 ($\phi_m = 0,1$).

3.1.27.2. Complejación en interfase (CIF)

En primer lugar, se prepararon 16,0 g de dispersiones acuosas de CSS (2,0 o 3,0 % P/P) a pH isoiónico en agua destilada por agitación magnética durante 2 h. Las dispersiones se mezclaron con 4 g de aceite de girasol y fueron sometidas a los 2 procesos de homogeneización descrito en la sección 3.1.26.1. Las emulsiones finales se diluyeron con 20 g de dispersiones acuosas de SSPS (2,0 o 3,0% P/P) con posterior ajuste de pH a 3,0 con solución de HCl 1,0 M. La fracción másica de fase dispersa de las emulsiones finales fue de 0,1 ($\phi_m = 0,1$).

3.1.27.3. Complejacion en interfase con posterior sonicación (CIFS)

Las emulsiones CIFS ($\phi_m = 0,1$) se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección anterior (sección 3.1.26.2). Luego se realizó una homogenización ultrasónica adicional en las mismas condiciones (3,0 min con secuencia *on/off* de 20 s, 20 kHz y 40 % amplitud), obteniendo emulsiones finales con tres procesos de homogeneización.

3.1.28. Tratamientos de estrés tecnológico sobre las emulsiones o/w

3.1.28.1. Congelación/descongelación

Las emulsiones recién preparadas (10 mL) se transfirieron a recipientes verticales de PVC con tapa plástica y 30 mm de diámetro interno y se almacenaron durante 24, 72 y 168 h en un freezer convencional a -18 ± 2 °C. Finalmente, las emulsiones se descongelaron en un baño de agua a 30 ± 2 °C durante 1 h y fueron inmediatamente caracterizadas (sección 3.1.28).

3.1.28.2. Agitación mecánica controlada

El tratamiento de agitación mecánica controlada se realizó colocando las emulsiones en una cabina de agitación orbital (Ferca TT400; Ferca Equipamientos, Buenos Aires, Argentina). Las condiciones del tratamiento fueron similares a las descritas en la sección 3.1.22.2. La desestabilización de las emulsiones se evaluó por medio de las técnicas de caracterización descritas en la sección 3.1.28.

3.1.29. Ensayos de caracterización de las emulsiones

3.1.29.1. Distribución de tamaño de partícula

La DTP de las emulsiones se determinó por dispersión estática de luz empleando un analizador Malvern Mastersizer 2000-E, asociado a una unidad de dispersión por vía húmeda Hydro 2000 MU Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido). Las condiciones de medición y la obtención de los parámetros correspondientes ($D_{3,2}$, $D_{4,3}$ y GF) se describieron detalladamente en la sección 3.1.23.1.

3.1.29.2. Comportamiento de flujo

El comportamiento de flujo de las emulsiones iniciales se realizó empleando un reómetro AR-G2 (TA Instruments, Waters LLC; Newcastle, DE, EE. UU.) asociado a una geometría cono-plato (diámetro 40 mm y ángulo 2° ; $gap = 1000 \mu m$). Los ensayos se realizaron a $25 \pm 1^\circ C$, en las mismas condiciones descritas en la sección 3.1.23.2. Las determinaciones se realizaron por triplicado y las curvas de flujo se ajustaron al modelo reológico de la Ley de Potencia (ecuación 49).

3.1.29.3. Evaluación de la microestructura

La microestructura de las emulsiones se evaluó empleando un lector multimodal de imagen Cytation 5 (BioTek Instruments, Inc.; Winooski, VT, EE. UU.), de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 3.1.23.4.

3.1.29.4. Evaluación de la estabilidad global en condiciones estacionarias por dispersión múltiple de luz

La estabilidad global de las emulsiones se determinó por dispersión de luz en un analizador vertical de barrido Turbiscan lab (Formulation, Francia) a una longitud de onda ($\lambda=850$ nm). Las emulsiones se colocaron en celdas cilíndricas (80 mm) y se registraron los valores de transmitancia (T%) y retrodispersion o *backscattering* (BS%) en función de la altura de la celda. Las emulsiones fueron almacenadas durante 7 días, realizando mediciones de los perfiles a los 3 y 7 días de almacenamiento. Para evaluar la estabilidad de las emulsiones se determinó el índice de estabilidad de Turbiscan (TSI). El TSI es un cálculo basado en los datos brutos que obtiene el analizador: a partir de los valores de transmitancia (T%) y *backscattering* (BS%), se obtiene como resultado un único número que refleja la desestabilización del sistema disperso. Cuanto mayor es el valor de TSI, mayor es la desestabilización en la muestra. El TSI se calculó como:

$$TSI = \sum_i \frac{\sum h |Barrido_i(h) - Barrido_{i-1}(h)|}{H} \quad (54)$$

Donde el barrido $i(h)$ es la transmitancia del i -ésimo barrido a una altura de h , y H es la altura total de la muestra medida (Wang, Li, & Zhang, 2018).

3.1.30. Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado ($n = 3$) y los resultados se informaron como el promedio $\pm$ desvío estándar. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias entre las medias se evaluaron usando la prueba de Fisher (LSD) a un nivel de significancia del 5% ($p < 0.05$). El análisis estadístico se realizó con el software Statgraphics Centurion XV (Statpoint Technologies Inc.; Warrenton, VA, EE. UU.).

3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la primera parte del presente capítulo se caracterizará el concentrado de suero de soja (CSS) en forma comparativa con el concentrado de suero de tofu obtenido a la misma temperatura (CST80). Siguiendo el mismo orden de los capítulos 1 y 2, en primer lugar, se evaluarán la composición química, las propiedades estructurales, el comportamiento superficial en la interfase aire/agua y las propiedades espumantes; en segundo lugar, se estudiará el comportamiento interfacial en la interfase aceite/agua, las propiedades emulsificantes y la estabilidad de las emulsiones O/W frente a tratamientos tecnológicos.

Finalmente, en la parte final del capítulo se estudiará la formación de complejos entre el CSS y el polisacárido soluble de soja (SSPS), el empleo en la formulación de emulsiones O/W en medio ácido (pH 3,0) y la estabilidad de las mismas frente a tratamientos de estrés tecnológico.

3.2.1. Composición química del suero de soja

En primer lugar, se analizó la composición del suero de soja (SS) elaborado en el laboratorio (sección 3.1.2). El SS presentó una densidad y un contenido de sólidos totales de 1066 ± 2 g/L y $25,0 \pm 2,0$ g/L, respectivamente. En la Tabla 24 se presentan los contenidos de proteína bruta ($N \times 6,25$), carbohidratos totales y cenizas hallados en el SS de partida. Los contenidos observados fueron similares a los informados para otros sueros de soja en trabajos anteriores (Li *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2018; Chua y Liu, 2019).

El análisis comparativo entre la composición química del ST y del SS reveló un menor grado de dilución del SS, acorde con un mayor contenido de sólidos totales (Tablas 7 y 23). Las condiciones de obtención y la materia prima usadas influyen sustancialmente en la composición de los sueros: el SS se obtuvo en el laboratorio en condiciones estandarizadas, donde se utiliza una relación másica definida entre la harina desgrasada y agua destilada en la preparación de la dispersión inicial (Sorgentini y Wagner, 1999); en cambio, el ST al ser recolectado como un efluente industrial presenta una mayor variabilidad de composición, aun en los obtenidos en la misma empresa elaboradora (Sobral, 2015).

Tabla 24: Composición química del suero de soja (SS) empleado en la preparación del concentrado del suero de soja.

Muestra	Proteína bruta (N×6,25) (g/L)	Hidratos de carbono totales (g/L)	Cenizas (g/L)
SS	4,3 ± 0,1	10,2 ± 0,3	2,5 ± 0,2

Los contenidos de proteína bruta (N×6,25) y de hidratos de carbono totales del SS fueron mayores a los del ST, resultado acorde con el mayor contenido de sólidos totales (Tablas 7 y 23). No obstante, el menor contenido de proteínas del ST también estaría asociado a una retención más eficiente de las mismas en la formación de la red proteica del tofu durante su elaboración industrial (Sobral *et al.*, 2018). En relación con los hidratos de carbono del SS, los mismos son de carácter no amiláceo debido a que la soja contiene sólo trazas de almidón (Karr-Lilienthal *et al.*, 2005). En la primera etapa de centrifugación de la dispersión acuosa alcalina de la harina de soja se elimina la mayor parte de los polisacáridos insolubles (Sorgentini y Wagner, 1999). Por ende, los hidratos de carbono presentes en el SS serían azúcares simples (sacarosa y oligosacáridos) y polisacáridos solubles que permanecen en dicho líquido luego de la precipitación isoelectrica de las proteínas de reserva.

Además, aunque el SS tiene un mayor contenido de sólidos totales, exhibió un contenido de cenizas inferior al del ST. Durante la obtención del tofu se emplean sales de calcio como agentes precipitantes y una parte importante del catión divalente permanece en el ST. (Ben Ounis *et al.*, 2008). Como se mencionó anteriormente, el calcio tiene una importante contribución al contenido de cenizas del ST (Tabla 7). En cambio, el contenido de minerales presentes en el SS, además de los propios aportados por la harina de soja de partida, provienen de los reactivos utilizados (NaOH y HCl) en las etapas de ajuste de pH durante su obtención (Sorgentini y Wagner, 1999). El contenido de calcio para el SS fue de 0,033 g/L el cual se obtuvo extrapolando los valores reportados para la harina de soja (Mateos *et al.*, 2009). Por lo tanto, el contenido de calcio es diez veces mayor en el ST (Tabla 7), lo cual se relaciona con los factores mencionados previamente. La composición química diferente del SS y del ST es esperable que influya en la composición y características de los concentrados obtenidos a partir de estos sueros.

3.2.2. Composición química, propiedades estructurales, superficiales y espumantes del concentrado obtenido a partir de suero de soja

En esta sección, se analizará la composición química y las propiedades estructurales, superficiales y espumantes del concentrado obtenido a partir del SS, cuya composición química se mostró en la sección anterior.

3.2.2.1 Rendimiento de obtención y composición química

El concentrado de suero de soja (CSS), obtenido a partir de una dispersión acuosa de harina de soja desgrasada, registró un rendimiento de obtención de 0,4 % P/P. Este valor fue similar al obtenido para el concentrado de suero de tofu obtenido a la misma temperatura (CST80, sección 1.2.2). La composición química del CSS se muestra en la Tabla 25. Este concentrado presentó un contenido de proteínas mayor que el de CST80, atribuyéndose al empleo de un SS más rico en proteínas (Tablas 7 y 24). Por medio de ensayos de calorimetría diferencia de barrido (DSC) se corroboró que las proteínas del CSS tienen un alto grado de desnaturalización, tomando como referencia el trabajo publicado por Sorgentini y Wagner (1999), donde la entalpía total de las proteínas nativas del suero de soja fue de $10,8 \pm 1,2$ J/g, frente a $1,7 \pm 0,5$ J/g en nuestro CSS, lo cual nos indica que solo habría un 15 % de proteínas nativas, o sea, con un 85% de desnaturalización. En los termogramas (dato no mostrado) se observó que la lectina está parcialmente desnaturalizada. No se observaron picos de KTI, por lo tanto, se supone que se encuentra totalmente desnaturalizado. Respecto al contenido de lisina total, el CSS no presentó diferencias significativas respecto al CST80; sin embargo, el contenido de lisina no reactiva (LNR) fue ligeramente mayor para el concentrado de suero de soja (Tablas 8 y 24). El tratamiento hidrotérmico y la disponibilidad de proteínas, azúcares simples reductores y polisacáridos con extremos reductores (en la cadena principal y las ramificaciones) son esenciales para promover la reacciones de glicosilación (Ingrassia *et al.*, 2017). En este caso, el grado de glicosilación ligeramente mayor del CSS podría atribuirse a un mayor porcentaje de proteína del SS y a diferencias en el contenido de hidratos de carbono disponibles para la glicosilación en ambos sueros.

Además, el contenido de cenizas y en especial, de calcio en el CSS fue menor en comparación con el de los concentrados de suero de tofu. Este resultado se atribuye a la presencia de ion calcio, que permanece en el ST después de la precipitación de las proteínas de reserva durante la elaboración del tofu (Ben Ounis *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2016) y no es totalmente eliminado en la etapa de diálisis durante la preparación de los concentrados (Tablas 7 y 8). En cambio, el bajo contenido de calcio del CSS se atribuye a que esta muestra proviene de la harina de soja de partida, y a que no se utilizan sales de calcio en el proceso de preparación del SS (sección 3.1.2).

Finalmente, el porcentaje de hidratos de carbono totales se atribuiría fundamentalmente a la presencia de polisacáridos no amiláceos solubles, dado que la mayor parte de los azúcares simples presentes originalmente en el SS se eliminaron durante la etapa de diálisis. De hecho, la relación másica proteína/hidratos de carbono totales del CSS fue muy superior a la observada en el SS (Tablas 23 y 24). El contenido de fibra dietaria total, determinada por el tratamiento gravimétrico-enzimático fue muy inferior al de hidratos de carbono totales; esta diferencia sería consistente con los diferentes procedimientos experimentales y componentes que contribuyen a cada determinación, como se mencionó en el capítulo anterior (sección 1.2.2.1).

Tabla 25: Composición química (% P/P , expresada en base seca) del concentrado de suero de soja (CSS) obtenido por tratamiento término del suero de soja a presión reducida 80 °C. El porcentaje de humedad (P/P) de CSS fue de $10,5 \pm 0,1$.

Composición química	CSS
Proteína cruda (N×6.25)	$51,4 \pm 0,3$
Lisina total (L)	$3,5 \pm 0,2$
Lisina no reactiva (LNR)	$30,4 \pm 0,1$
Carbohidratos totales	$38,9 \pm 0,7$
Fibra dietaria total	$21,2 \pm 0,4$
Cenizas	$7,9 \pm 0,1$
Calcio total	$0,30 \pm 0,05$

Los parámetros de composición se expresaron como el promedio de tres determinaciones independientes ($n = 3$) $\pm$ desvío estándar. LNR se expresó como % P/P sobre LT.

3.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con triquina (TSDS-PAGE)

La composición polipeptídica del CSS se analizó por TSDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras. En ausencia de agente reductor (Figura 66a) se observa en la parte superior del gel apilador la presencia de agregados proteicos de alto PM que permanecen en el punto de siembra. En la zona superior del gel separador se observaron bandas tenues de PM entre 60 y 90 kDa correspondiente a subunidades de β -conglucina (Nishinari *et al.*, 2014). Además, se evidenciaron las bandas correspondientes a la subunidad de lectina (~35 kDa) y al KTI (~20 kDa) (Li *et al.*, 2018). Por debajo de 14 kDa se observaron bandas muy tenues, las cual se pueden asociar a péptidos de bajo peso molecular y a la presencia del BBTI (Ren *et al.*, 2009; Nishinari *et al.*, 2014).

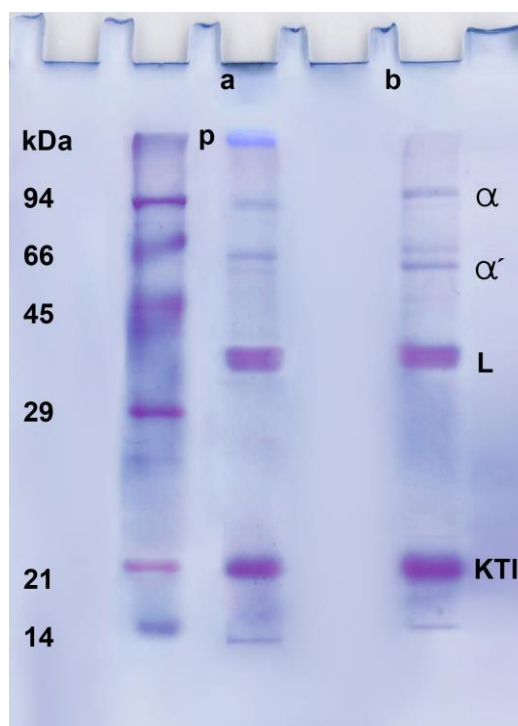


Figura 66: Perfil de TSDS-PAGE del concentrado proteico de suero de soja (CSS) obtenido por tratamiento térmico del suero de soja a presión reducida a 80 °C: a) condiciones no reductoras. b) condiciones reductoras en presencia de β -mercaptoetanol. Marcadores de peso molecular (PM): α -lacto albúmina, 14,4 kDa; inhibidor de tripsina, 20,1 kDa; anhidrasa carbónica, 30,0 kDa; ovoalbúmina, 43,0 kDa; albúmina de suero bovino, 67,0 kDa y fosforilasa b, 94,0 kDa. La letra P indica la presencia de agregados proteicos en la parte superior del gel apilador.

En condiciones reductoras (Figura 66b), se observó casi una desaparición completa de la banda de agregados en la parte superior del gel apilador, con un incremento leve en la intensidad de las bandas correspondientes a las subunidades de la β -conglucina y de KTI. Este resultado se atribuiría a la estabilización de los agregados por enlaces disulfuro, dado que desaparecieron en presencia de β -mercaptoetanol. En base a los resultados obtenidos, la composición polipeptídica del CSS con una prevalencia del KTI y la lectina, fue similar a la informada en trabajos previos para proteínas aisladas del SS (Li *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2009).

El análisis comparativo de los perfiles TSDS-PAGE de CSS y CST80 reveló una mayor contribución de las subunidades de la β -conglucina en CST80 así como la presencia de la fracción BPM que no se evidenció en el CSS (Figuras 31 y 66). En la preparación del SS, el ajuste a pH 4,5 fue muy eficiente para precipitar casi totalmente las proteínas de reserva, en tanto que el tratamiento de la leche de soja con sales de calcio durante la elaboración industrial del tofu no removió totalmente la β -conglucina, quedando parte de la misma en el ST y por ende, en CST80.

3.2.2.3. Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 67 se muestra el espectro FTIR del CSS en la región denominada *fingerprint* (1800–800 cm^{-1}). En el mismo se observaron los picos característicos de amida I y amida II a 1647 y 1545 cm^{-1} , respectivamente (Nakamura *et al.*, 2006) y amida II' (1390–1340 cm^{-1}) y amida III (1271–1311 cm^{-1}) (Singh, 2000), los cuales se atribuyen principalmente a la presencia de proteínas en el concentrado. Las señales observadas a partir de $\sim 1315\text{cm}^{-1}$ corresponden a las vibraciones oscilantes de CH_2 en las pectinas (galactomananos) y las bandas de adsorción a 1044, 1073 y 1143 cm^{-1} corresponden a la zona de adsorción de polisacáridos (Černá *et al.*, 2003). En la figura 67b se realizó una deconvolución espectral y se observa una atenuación en el pico 1611 cm^{-1} , el cual corresponde a la flexión del enlace NH del grupo amida y los residuos de glutamina (Kong y Yu, 2007). La atenuación en esta banda también se evidenció en CST80 (Figura 67c), lo que estaría indicando la disminución en la movilidad de las cadenas laterales de aminoácidos, promovido por el tratamiento térmico a 80°C. En el CSS también se observaron cambios en los picos entre 1641 cm^{-1} y 1645 cm^{-1} y una marcada

disminución del pico 1670 cm^{-1} , al igual que en el concentrado obtenido a 80°C sin neutralización (Figura 67c), lo que estaría indicando un desorden en la estructura de los concentrados obtenidos a mayor temperatura (Krimm y Bandekar, 1986; Kong y Yu 2007).

En CSS se redujo la intensidad en las bandas de adsorción en la región de amida I y amida II respecto a CST80. Por lo tanto, el tratamiento térmico afectó en mayor medida la estructura secundaria de las proteínas del SS, por el incremento en la interacción entre biopolímeros, lo cual se refleja en una mayor glicosilación (Tablas 8 y 25). Ingrassia *et al.* (2017) reportó la disminución significativa en la banda de adsorción de las amidas, inducida por la glicosilación y agregación de las proteínas de la harina de soja. No obstante, en este caso también hay un efecto de la diferente composición química y polipeptídica de las muestras en la intensidad de las bandas de absorción.

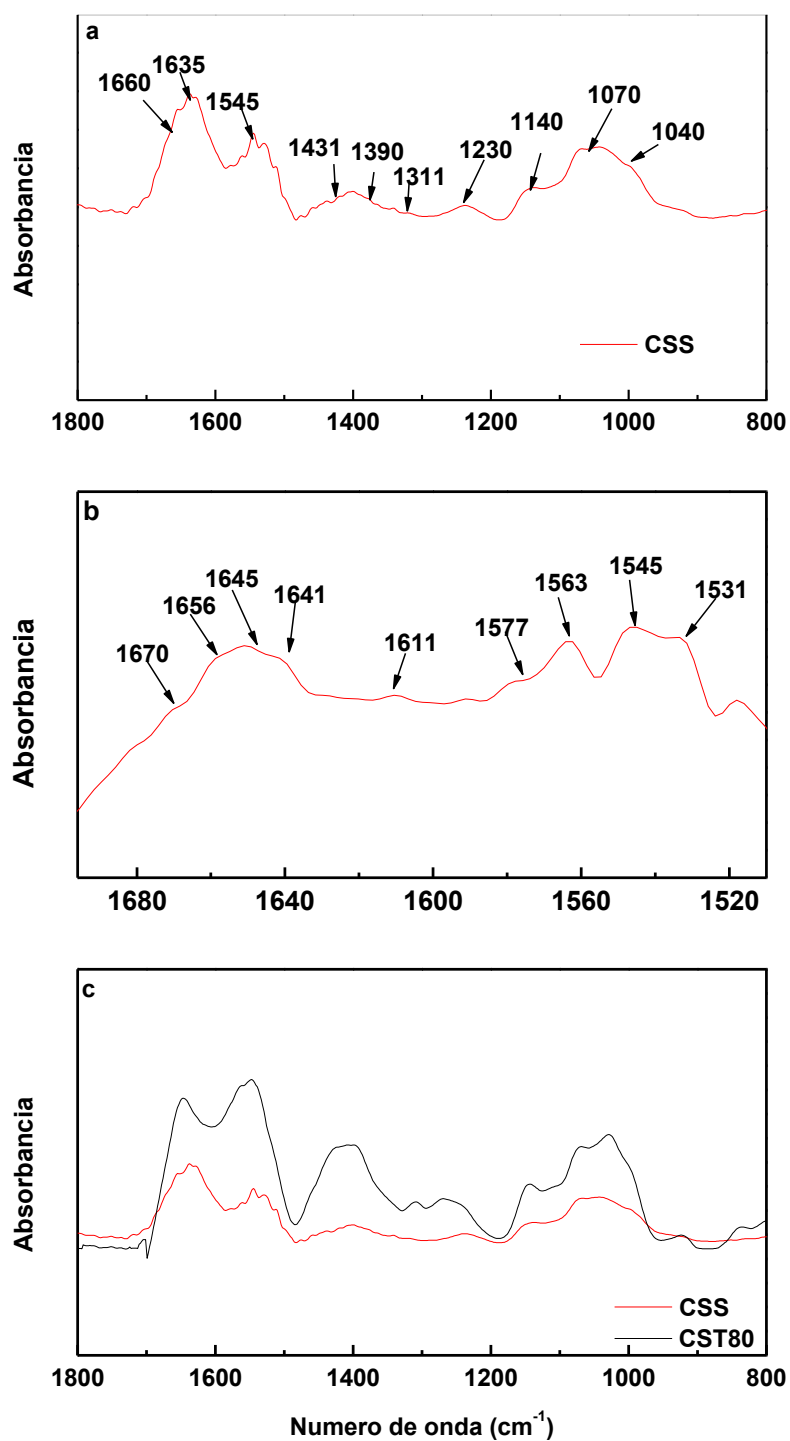


Figura 67: a) Espectro FTIR (1800–800 cm⁻¹); b) espectro FTIR (Zonas de amida I-II, 1680–1520 cm⁻¹ luego de una deconvolución espectral) del concentrado de suero de soja (CSS) obtenido por tratamiento térmico del suero de soja a presión reducida a 80°C y c) comparativo de los espectros FTIR (1800–800 cm⁻¹) del concentrado de suero de tofu obtenido a la misma temperatura (CST80) y CSS. Los espectros obtenidos son el resultado de 45 barridos con una resolución de 4 cm⁻¹.

3.2.2.4. Análisis termo-gravimétrico (TGA)

La estabilidad del CSS a la termodegradación se estudió por TGA en atmósferas de nitrógeno y aire, en un programa de calentamiento similar al realizado para los concentrados de suero de tofu (Figuras 33 y 42). Para el CSS también se definieron tres zonas de termodegradación, I, II y III (Figura 68). En primer lugar, la transición a temperaturas inferiores a 150 °C sería consistente con la pérdida de humedad o deshidratación del concentrado (Ogale *et al.*, 2000; Park y Bell, 2004). Los picos observados en la zona I ($T_p = 210,8$ °C) y II ($T_p = 310,2$ °C) se atribuirían a la descomposición térmica parcial de proteínas y polisacáridos, respectivamente (Kumar *et al.*, 2010; Kadam *et al.*, 2013; Werner *et al.*, 2013). En la zona III, se observó un pico ancho ($T_p = 534,5$ °C), vinculado a la descomposición térmica de los biopolímeros parcialmente degradados, lográndose con la incorporación de aire a 700 °C, la oxidación completa. En películas biodegradables de suero lácteo (WPI) y aislado proteicos de soja (SPI) se han reportado eventos térmicos a temperaturas cercanas a las nuestras (Kumar *et al.*, 2010; Song *et al.* 2011; Kadam *et al.*, 2013).

La pérdida de masa (Δm) fue mayor para el concentrado de suero de soja en la zona I donde hay una reducción en la masa del 32,5 % en tanto para CST80 solo se reduce el 10,9 %, luego en la zona II en CSS la degradación ocurre en una sola transición a 310 °C, en tanto en CST80 hay dos transiciones adicionales a mayor temperatura (Tabla 26). Además, a 700 °C la pérdida parcial de masa para CSS y CST80 fue de 92,8 y 58,0 %, respectivamente. La mayor estabilidad térmica de CST podría atribuirse a las diferencias en la composición química y específicamente al mayor contenido de sales, especialmente de calcio, que otorga estabilidad térmica a los biopolímeros presentes en los concentrado (Sorgentini y Wagner 1999; Sobral *et al.*, 2010). Además, el concentrado de suero de soja tiene sus proteínas en un menor estado de agregación, respecto a CST80, incrementando la susceptibilidad de las proteínas a la degradación térmica. Estos resultados se pueden corroborar por medio de los ensayos de solubilidad proteica, los cuales se discutirán en una sección posterior (3.2.2.6)

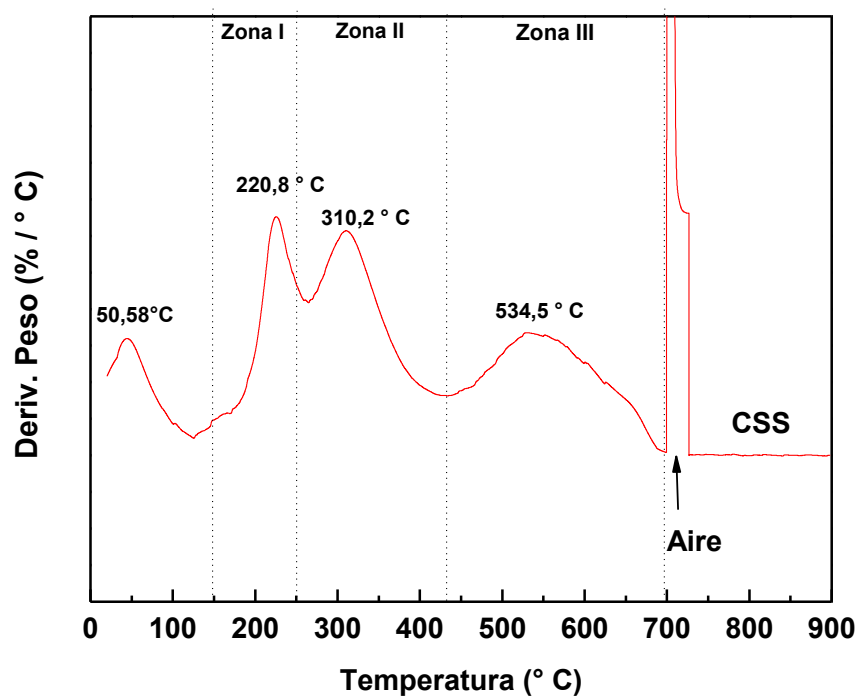


Figura 68: Perfiles diferenciales de degradación térmica de concentrado de suero de soja (CSS) obtenido por tratamiento térmico del suero de soja a presión reducida a 80 °C. Condiciones de calentamiento: 20–700 °C (atmósfera de nitrógeno); 700–900 °C (atmósfera de aire). Velocidad de calentamiento: 10 °C·min⁻¹.

Tabla 26: Parámetros de termodegradación obtenidos por análisis termo-gravimétrico (TGA) de concentrado de suero de soja (CSS) obtenido por tratamiento del suero de soja a presión reducida a 80 °C. A fines comparativos, se muestran los parámetros de termodegradación de CST80. En cada zona de termodegradación de la curva derivada del TGA (Figura 71), se obtuvieron las temperaturas de pico (Tp°C) y la pérdida parcial de masa (Δm , %).

Zona	Parámetros	Muestra	
		CSS	CST80
Zona I (150–260 °C)	Tp 1	220,8 ± 0,5 ^a	224,7 ± 0,6 ^b
	$\Delta m1$	32,5 ± 0,7 ^b	10,9 ± 0,5 ^a
Zona II (260–430°C)	Tp 2	310,2 ± 0,4 ^b	303,0 ± 0,6 ^a
	Tp 2'	Sin pico	339,8 ± 0,5
	Tp2''	Sin pico	380,2 ± 0,5
	$\Delta m2$	30,50 ± 0,3 ^a	38,1 ± 0,3 ^b
Zona III (430–700°C)	Tp 3	534,5 ± 0,5 ^a	650,3 ± 0,5 ^b
	$\Delta m3$	16,4 ± 0,6 ^b	0,8 ± 0,1 ^a

Los valores promedio en una misma fila seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según lo determinado por la prueba de Fisher.

3.2.2.5. Dependencia de la turbidez y el potencial- ζ con el pH

En esta sección se evaluó la dependencia del pH sobre la turbidez de las dispersiones acuosas de CSS en agua, urea 6,0 M y urea 6,0 M+DTT 30 mM (Zhu *et al.*, 2017). A fines comparativos, se incluyeron las curvas de turbidez de CST80 (Figura 69). Al inicio del ensayo, la dispersión de CSS en agua destilada mostró un valor de pH ~ 5,5 (Figura 69). El bajo pH inicial de la dispersión acuosa del CSS está asociado al pH inicial del SS de partida (pH 4,5, sección 3.1.3), dado que el mismo no fue neutralizado antes de la etapa de diálisis. Al descender el pH la turbidez se incrementó hasta obtener valores máximos con dos picos en CSS a 2,6 y 3,7, en tanto que CST80 exhibió un valor máximo definido a pH 4,4. Con el posterior agregado de solución de HCl hasta pH 2,0, se observó una leve disminución de la turbidez. Como se mencionó anteriormente, la máxima turbidez se asocia al debilitamiento de la repulsión electrostática entre las moléculas de biopolímeros favoreciendo la auto-asociación.

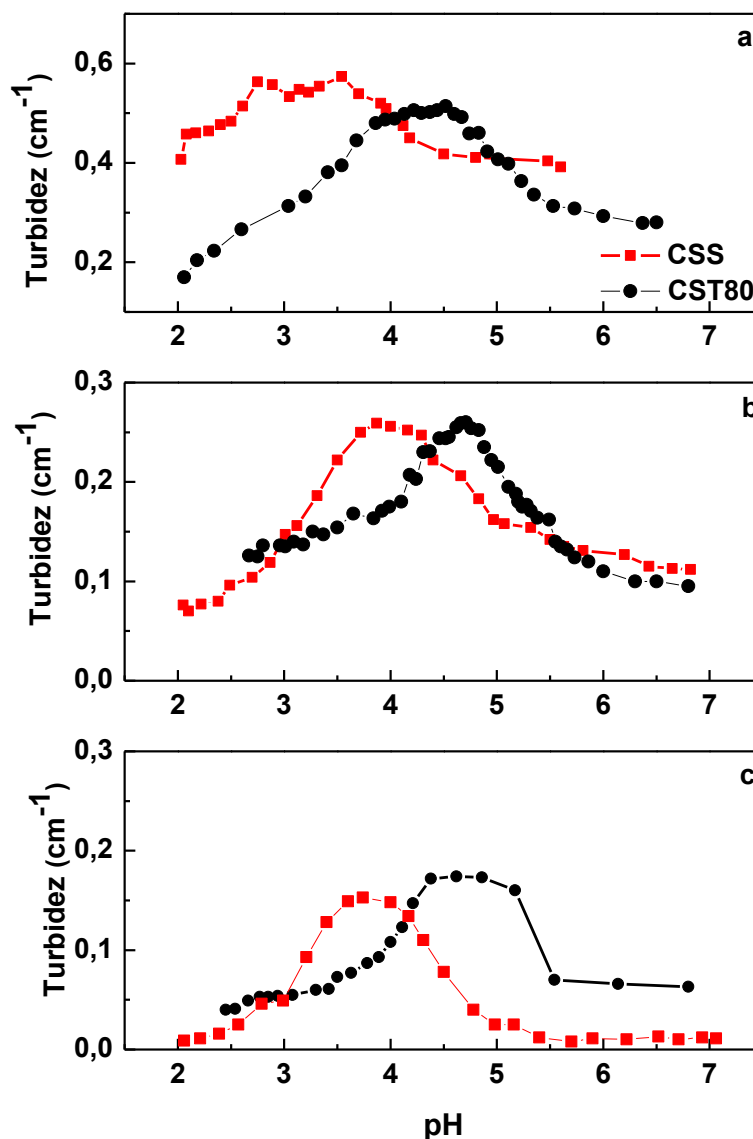


Figura 69: Efecto del pH sobre la turbidez de dispersiones acuosas (0,1 % P/P) de concentrados de sueros de soja (CSS) y de tofu (CST80) obtenidos por tratamiento térmico de los sueros a presión reducida a 80 °C: a) en agua destilada; b) en solución de urea 6,0 M; c) en solución de urea 6,0 M + ditioneitol (DTT, 30 mM).

Además, la variación de potencial- ζ en función del pH en dispersión acuosa se muestra en la Figura 70. El CSS exhibió una carga cercana a cero a pH entre 3,0 y 4,0. Este resultado se asocia al mayor grado de agregación que presentó la muestra en este rango de pH (Figura 69a) y estaría de acuerdo con la cercanía al punto isoeléctrico de las proteínas de suero de soja ($\sim$ pH 4,5) (Song *et al.*, 2011). Dado que los concentrados, además de proteínas tienen polisacáridos, la agregación puede estar relacionada con la carga de dichos polisacáridos. Bajo determinadas condiciones el pH de agregación puede coincidir con el pKa (3,0) de los restos de

ácido galacturónico de los polisacáridos ácidos presentes en el CSS (Nakamura *et al.*, 2001). Además, el potencial- ζ a pH entre 4,0 y 7,0 fue negativo, exhibiendo un comportamiento esperado en este sistema. Ray y Rousseau (2013) evaluaron la variación del potencial- ζ con el pH en proteínas aisladas del suero de soja, preparadas a partir del SS con el procedimiento clásico de precipitación con sulfato de amonio (Sorgentini y Wagner, 1999). La muestra de proteínas aisladas, a diferencia del CSS, contienen un contenido bajo de polisacáridos. Los resultados de nuestro trabajo fueron similares a los informados por Ray y Rousseau (2013), obteniendo valores de potencial- ζ levemente más negativos en el rango de pH 4,0–7,0 y cercanos a 0 mV en el rango de pH 2,0–4,0. Además al comparar la variación del potencial- ζ con el pH de CSS y CST80, ambos mostraron una carga neta nula a pH cercano a 4,0. Además, CSS primero exhibió un potencial- ζ más negativo en el rango de pH 5,0–7,0 y al mismo tiempo, menos positivo en el rango de pH 2,0–3,0, respecto al de CST80 (Figura 70). Las diferencias observadas entre ambos concentrados se pueden atribuir a la diferente composición polipeptídica (Figuras 31 y 66) y fundamentalmente, al impacto del calcio presente en CST80 que interacciona con los restos de glutamato y aspartato de las moléculas de proteína y los restos de ácidos urónicos de los polisacáridos. El Ca^{2+} , además de apantallar la repulsión electrostática en restos cargados negativamente, puede también afectar el pKa de dichos grupos ionizables (Malhotra y Coupland 2004; Carneiro-Da-Cunha *et al.*, 2011).

Por otra parte, se realizaron ensayos de la variación de la turbidez en presencia de urea 6,0 M (Figura 69b). Para ambos concentrados se registró un descenso de la turbidez en presencia de urea 6,0 M lo cual sería consistente con la disociación de los agregados de los biopolímeros por la presencia del agente caotrópico. A diferencia de lo observado en agua destilada, para CSS se observó claramente un valor máximo de turbidez a un pH cercano a 4,0 y un descenso sostenido al disminuir el pH hasta 2,0, por lo que el efecto de disociación de la urea tendría un mayor impacto en los polisacáridos. Además, CSS y CST80 mostraron valores similares de turbidez, pero valores máximos a diferentes valores de pH; nuevamente, este resultado estaría asociado a la diferente composición polipeptídica y del contenido de calcio en ambos concentrados.

Como se mencionó anteriormente, en ambos concentrados se evidenció la presencia de agregados estabilizados por puentes disulfuro (TSDS-PAGE, Figuras 31 y 66). La disminución de la turbidez en los ensayos realizados en presencia de DTT serían consistentes con una disociación adicional promovida por la reducción de los puentes disulfuro (Figuras 69b y c).

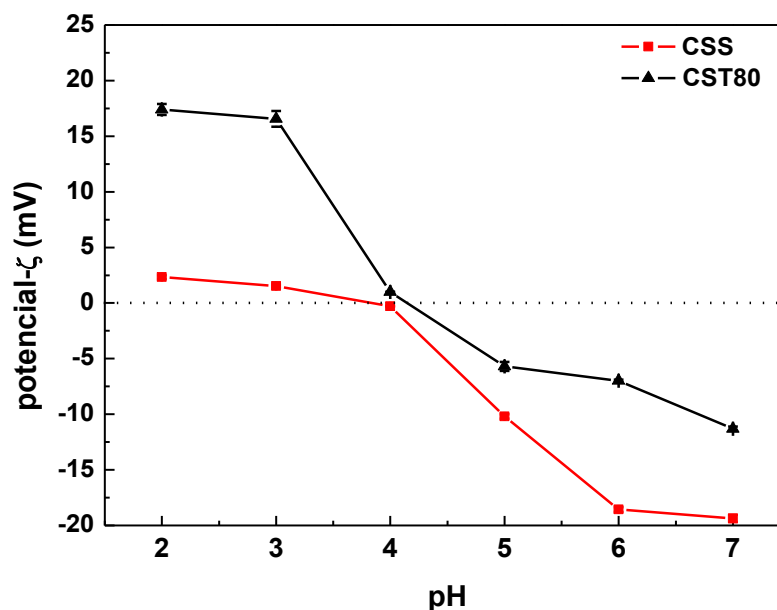


Figura 70: Efecto del pH sobre el potencial- ζ medido en dispersiones acuosas de concentrados de sueros de soja (CSS) y tofu (CST80) obtenidos por tratamiento térmico de los sueros de soja y tofu a presión reducida a 80 °C.

3.2.2.6. Dependencia de la solubilidad de proteínas e hidratos de carbono con el pH

La solubilidad proteica (S_P) y la solubilidad de hidratos de carbono (S_{HC}) para el CSS, en comparación con CST80, se presentan en la Figura 71. El CSS exhibió una S_P superior al 72,0% P/P en todo el rango de pH evaluado (2,0–7,0), presentando el menor contenido de proteína soluble a pH 4,0 (Figura 71a). Este resultado sería consistente con los altos valores de turbidez observados y el potencial- ζ cercano a 0 mV a pH 4,0 (Figuras 69a y 70), por lo cual incrementa la asociación entre las moléculas de proteínas debido al debilitamiento de la repulsión electrostática y la mayor contribución de las interacciones hidrofóbicas reduciendo consecuentemente la S_P (Kasran *et al.*, 2013).

En el CSS, los hidratos de carbono fueron altamente solubles con una S_{HC} superior al 90,0% P/P en casi todo el rango de pH (2,0–7,0), con un mínimo a pH 3,0 (85,0% P/P , Figura 71a). De acuerdo con el valor observado de LNR del CSS ($\sim 30\%$ P/P sobre LT, Tabla 24), los polisacáridos podrían intervenir en reacciones de glicosilación y por ende, producir cambios estructurales y en la carga neta en estas moléculas de biopolímeros. No obstante, el valor

mínimo a pH 3,0 sería atribuible a un mayor grado de asociación dado que los polisacáridos ácidos presentan una carga neta cercana a cero en el rango de pH 2,5–3,0 (Nakamura *et al.*, 2003; Porfiri y Wagner 2018). Este comportamiento no fue observado en CST80 por lo que el tratamiento térmico a 80 °C afectó las propiedades estructurales de los polisacáridos y, por ende, su S_{HC} a distintos pH. En este contexto, un tratamiento térmico más suave como el empleado al preparar CST50 no tuvo un efecto similar, acorde a un valor mínimo de S_{HC} a pH 3,0 para este concentrado (Figura 36a y c).

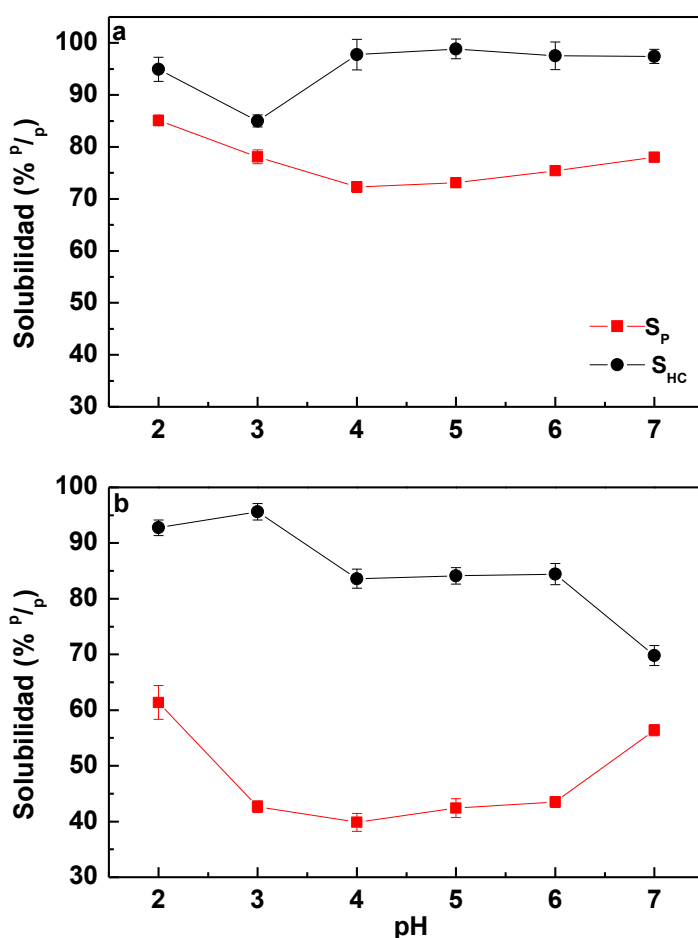


Figura 71: Efecto del pH sobre la solubilidad proteica (S_P) y de hidratos de carbono (S_{HC}) de los concentrados de sueros de soja (CSS) y tofu (CST80) obtenidos por tratamiento térmico de los sueros a presión reducida a 80°C. a) CSS y b) CST80. La concentración de muestra en las dispersiones acuosas fue de 0,1% P/P. Los valores se expresaron como el promedio de tres determinaciones independientes ($n=3$) $\pm$ desvío estándar.

Las diferencias observadas en la S_P entre CSS y CST80 en todo el rango de pH se atribuyen a las condiciones de procesamiento y a la diferente composición química de los

sueros de partida. Las proteínas del ST están totalmente desnaturalizadas y en parte, se insolubilizan formando agregados (Palazolo *et al.*, 2013; Sobral *et al.*, 2011; Sobral y Wagner, 2009). Ambos procesos de desnaturalización y agregación se generan durante los numerosos tratamientos térmicos aplicados en la producción industrial del tofu y son favorecidos por la presencia de calcio. Luego, en la preparación del concentrado, la agregación es exacerbada en el tratamiento térmico de concentración a 80 °C y en la liofilización, promoviendo las interacciones de carácter hidrofóbico y la formación de enlaces disulfuro. El SS, con un pH inicial de 4,5, proviene de una harina de soja activa (sección 3.1.1) y el único tratamiento térmico se realiza en la etapa de concentración a 80 °C, desnaturalizando casi completamente a las proteínas (Sección 3.2.2.1). Aunque en estas condiciones, también se produce glicosilación incipiente y agregación por interacciones hidrofóbicas y por enlaces disulfuro, el impacto sobre la reducción de la S_p no es tan marcado, debido también a la muy baja concentración de calcio.

En la Figura 72 se muestra el efecto del pH sobre la relación másica de carbohidrato a proteína en la fracción soluble para ambos concentrados. A diferencia de lo observado en CST80, la fracción soluble de CSS está compuesta por proteínas y carbohidratos en una proporción másica similar (0,8–1,0). El valor más bajo observado a pH 3,0 sería consistente con la mínima S_{HC} en esta condición (Figura 71).

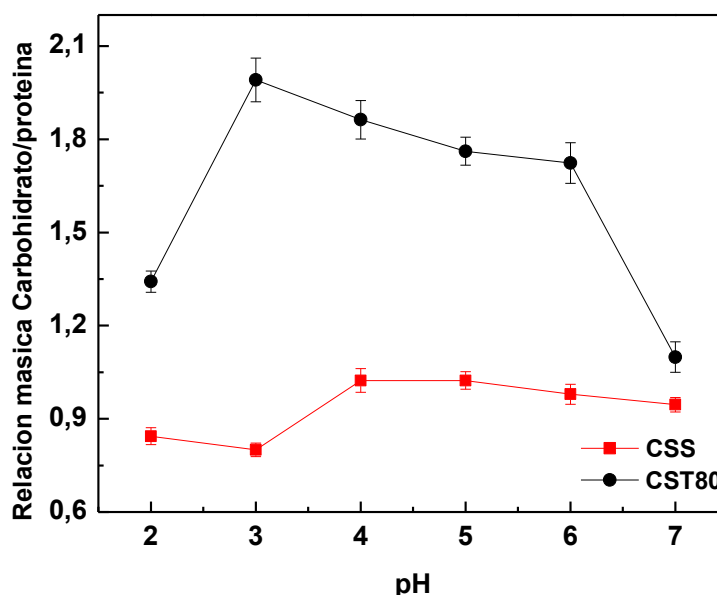


Figura 72: Efecto del pH sobre la relación másica carbohidratos/proteína en la fracción soluble de los concentrados de sueros de soja (CSS) y tofu (CST80) obtenidos por tratamiento térmico de los sueros a presión reducida a 80 °C.

3.2.2.7. Evaluación del comportamiento superficial en la interfase agua/aire del concentrado proteico de suero de soja

La influencia del pH sobre la presión superficial de equilibrio (π_s) del CSS se muestra en la Tabla 27. Los valores de π_s oscilaron entre 27,07 a 31,60 mN/m registrándose a pH 4,0 el valor más elevado de π_s ($p < 0,05$). De acuerdo con los resultados de turbidez en agua destilada (Figura 69a), en el rango 3,0–4,0 se registró la mayor auto-asociación para los biopolímeros presentes en CSS y al mismo tiempo, valores mínimos de S_P y de S_{HC} a pH 4,0 y 3,0, respectivamente (Figura 71a). A este pH, el potencial- ζ fue cercano a 0 mV (Figura 70) y por ende, el debilitamiento de la repulsión electrostática y la contribución del efecto hidrofóbico promovería una adsorción más eficiente en la interfase/agua aire y un incremento más pronunciado de la π_s (Rodríguez Patino y Pilosof, 2011).

Tabla 27: Efecto del pH sobre la presión superficial de equilibrio (π_s) de los concentrados de sueros de soja (CSS) y tofu (CST80) obtenidos por tratamiento térmico de los sueros a presión reducida a 80 °C.

pH	π_s (mN/m)	
	CSS	CST80
2,0	29,01 ± 0,05 ^{c,A}	30,84 ± 0,10 ^{c,B}
3,0	29,21 ± 0,28 ^{bc,A}	30,24 ± 0,08 ^{a,B}
4,0	31,60 ± 0,40 ^{e,A}	31,02 ± 0,06 ^{d,A}
5,0	29,91 ± 0,07 ^{d,A}	30,65 ± 0,09 ^{b,B}
6,0	28,91 ± 0,09 ^{b,A}	30,26 ± 0,06 ^{a,B}
7,0	27,07 ± 0,11 ^{a,A}	30,30 ± 0,08 ^{a,B}

Los valores de presión superficial (π_s) se expresaron como el promedio de tres mediciones independientes ($n = 3$) ± desvío estándar. Los valores promedio de π_s en una misma columna seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher. Los valores promedio de π_s en una misma fila seguidos de letras mayúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según lo determinado por la prueba de Fisher.

El análisis comparativo entre la π_s de ambos concentrados al mismo pH reveló que, excepto a pH 4,0, la actividad superficial fue levemente más alta en CST80 ($p < 0,05$). Este resultado no estaría directamente asociado con la presencia de proteínas solubles, dado que la S_p de CST80 fue significativamente inferior a la de CSS (Figura 71). Por consiguiente, estos resultados serían consistentes con una contribución de la fracción insoluble en la adsorción interfacial. Además, la menor actividad superficial del CSS estaría también asociada al estado de desnaturalización de las proteínas, dado que en esta muestra las mismas no están totalmente desnaturalizadas (sección 3.2.2.1). No obstante, debido a la extraordinaria complejidad en la composición química de ambas muestras, las diferencias observadas estarían asociadas con diferentes condiciones del entorno como la fuerza iónica y la presencia de calcio y las interacciones con los polisacáridos (Pezennec *et al.*, 2000; Rodríguez Patino y Pilosof, 2011).

Además, se evaluó la evolución de la viscosidad compleja superficial (η^*) en función del tiempo (Figura 73). En todos los pH evaluados (2,0 a 7,0) η^* aumento rápidamente para CSS, sin embargo la adsorción de la muestra en la superficie no logró un valor máximo durante el tiempo del experimento (30 min), lo que puede indicar una adsorción incompleta y/o reestructuración de la interfase debido a la interacción entre los componentes adsorbidos (Dickinson, 1992; Porfiri y Wagner 2018). La influencia del pH sobre el comportamiento superficial fue evidente a pH 3,0 y 4,0, donde los valores de η^* al final del ensayo fueron mayores (Figura 73a). A los pH mencionados en la dispersión acuosa se registró la mayor auto-asociación entre los biopolímeros (Figura 69a), por lo que la mayor viscoelasticidad de la película interfacial se atribuiría a la mayor adsorción de partículas agregadas en la interfase aire/agua, reforzando lo mencionado sobre la contribución de la fracción insoluble al comportamiento interfacial (Damodaran, 2006; Jose *et al.*, 2016; Cabezas *et al.*, 2019). Sin embargo, a los demás pH (2,0, 5,0, 6,0 y 7,0) se evidenció la formación de películas viscoelásticas más débiles (Figura 73a). Como η^* depende de la intensidad de las interacciones entre las especies adsorbidas (Baldursdottir *et al.*, 2010), este resultado sugiere que el debilitamiento de la repulsión electrostática tiene un rol preponderante en la formación de películas más viscoelásticas.

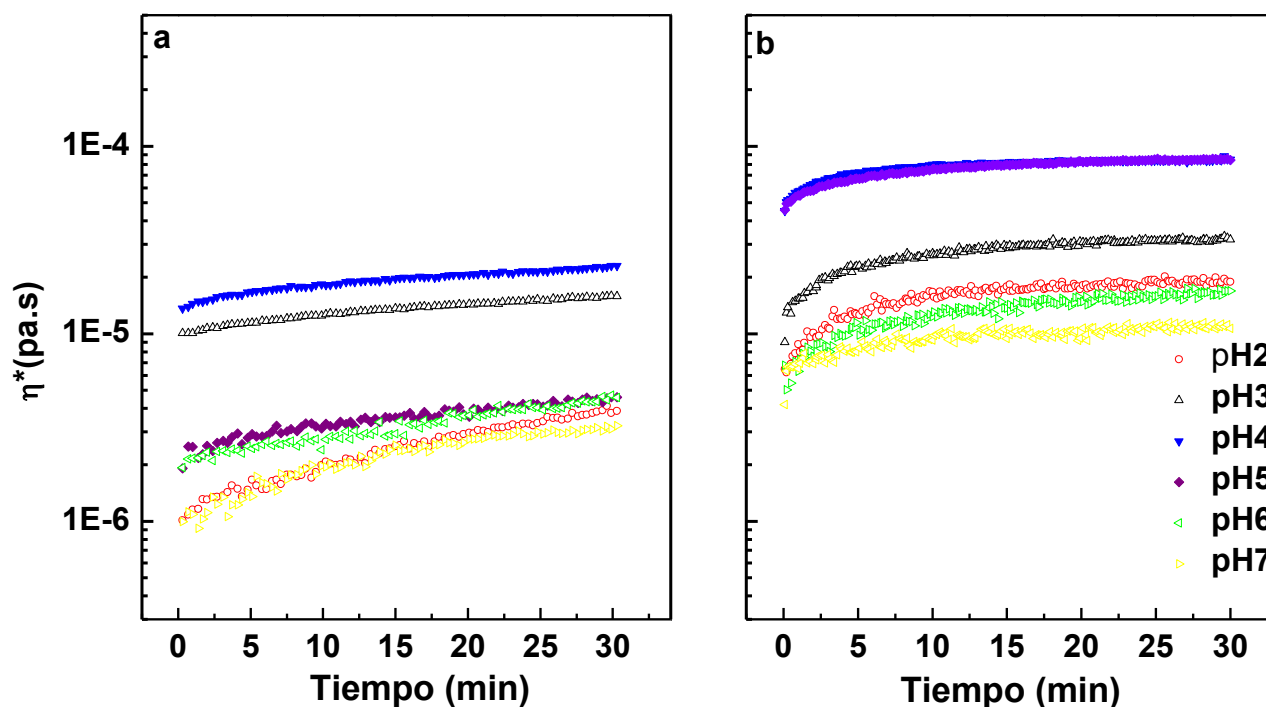


Figura 73: Perfiles de viscosidad compleja (η^*) en función del tiempo, en la interfase aire /agua para los concentrados de suero de soja (CSS) y de tofu (CST80) a diferentes pH: a) CSS b) CST80. Los ensayos fueron realizados a una concentración equivalente de proteína (1,0 % p/p). Los valores de η^* se expresaron como el promedio de tres mediciones independientes ($n = 3$) $\pm$ desvío estándar.

Los módulos superficiales de viscosidad compleja para CST80 fueron mayores respecto a CSS en casi todos los pH evaluados (Figura 73b). Debido a que los ensayos fueron realizados a concentración equivalente de proteína y la S_p fue significativamente más baja en CST80, el resultado no sería atribuible un mayor contenido de proteínas solubles, por lo que los valores más altos de η^* estarían asociados a la adsorción de especies de la fracción insoluble (Henao Ossa *et al.*, 2020).

3.2.2.8. Evaluación de las propiedades espumantes del concentrado proteico de suero de soja

La formación de espuma está influenciada por la adsorción del agente espumante en la interfase aire/agua y su capacidad para reducir rápidamente la tensión superficial. Sin embargo,

la estabilización de la espuma requiere diferentes propiedades superficiales, como la formación de una película viscoelástica cohesiva, favorecida por las interacciones intermoleculares entre las especies adsorbidas en la interfase (Dickinson y McClements, 1995). En la Figura 74 se presenta el overrun generado en función de pH para el CSS. En todo el rango de pH (2,0–7,0) el CSS presentó la capacidad de formación de espuma, registrándose el valor más alto a 4,0 y un poco menor a 5,0; por lo tanto, el incremento de la capacidad de incorporación de aire en CSS se relaciona con el incremento de la actividad superficial (π_s) a los pH mencionados (Tabla 27). Estos resultados se asocian a los reportados por Martínez *et al.* (2009), quienes encontraron una relación entre el overrun y la actividad interfacial de hidrolizados de proteína de soja en la interfase aire/agua.

La estabilidad de las espumas de CSS, evaluada a través del tiempo medio de colapso ($t_{1/2}$), fue también mayor a pH 4,0, pero a diferencia del overrun, le sigue en orden el pH 3,0, siendo muy baja la estabilidad a pH 5,0 (Figura 74). Justamente a pH 4,0 y 3,0 se evidenció una mayor asociación entre los biopolímeros y valores de potencial- ζ cercanos a 0 mV, mientras que los valores mínimos de S_p y de S_{HC} fueron a pH 4,0 y 3,0, respectivamente (Figuras 60a, 70 y 71). Por lo tanto, esto último indicaría que la estabilidad de la espuma de CSS está influenciada en primer lugar por las interacciones entre proteínas y en segundo lugar por polisacáridos. Por lo tanto, el efecto de la asociación de los biopolímeros en la viscoelasticidad de las películas formadas debe influir fuertemente en la estabilidad de las espumas. De hecho, y en concordancia con la mayor estabilidad a pH 4,0, seguida por el pH 3,0, en la Figura 73 se observó que justamente a estos pH, en el mismo orden, se alcanzaron los mayores valores de η^* a nivel interfacial.

El análisis comparativo de las propiedades espumantes de ambos concentrados reveló que en el rango de pH 3,0–5,0 y a concentración equivalente de proteína, los valores de overrun y de $t_{1/2}$ fueron significativamente mayores para CST80 (Figura 74). Aunque la S_p es más alta en el CSS (Figura 71), la mayor capacidad espumante y la estabilidad de las espumas de CST80 estarían asociadas con la adsorción de agregados presentes en la fracción insoluble (Murray *et al.*, 2011) y la formación de películas de mayor viscoelasticidad (Figura 73b). Además, el mayor overrun para CST80 podría también estar vinculado con el estado de desnaturalización de las proteínas presentes en los concentrados. De hecho, el ST es un líquido que ha sufrido tratamientos térmicos enérgicos y, por ende, tiene sus proteínas totalmente desnaturalizadas, en tanto que en el CSS hay aún proteínas desnaturalizadas parcialmente (sección 3.2.2.1). Como es sabido, las proteínas desnaturalizadas exponen sus zonas

hidrofóbicas y tienen mayor posibilidad de interactuar con la interfase aire/agua (Sorgentini y Wagner, 2002), acorde a la mayor actividad superficial de CST80 en casi todo el rango de pH (Figura 73).

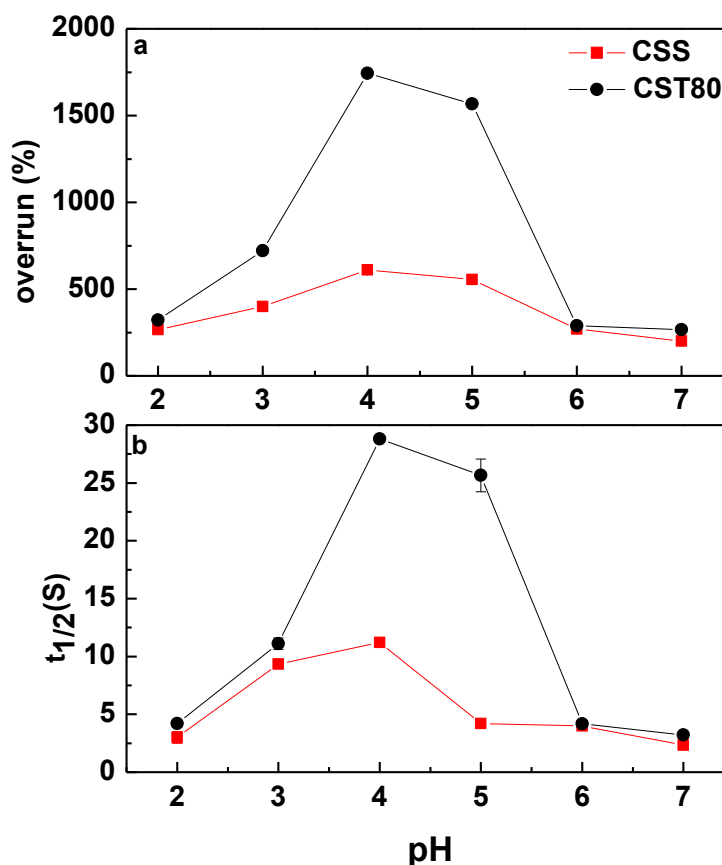


Figura 74: Efecto del pH sobre a) el Overrun (%) y b) el tiempo medio de colapso ($t_{1/2}$) de las espumas preparadas con dispersiones acuosas (1,0% proteína P/P) de concentrados de sueros de soja (CSS) y tofu (CST80) obtenidos por tratamiento térmico de los sueros a presión reducida a 80 °C. Los parámetros se expresaron como el promedio de tres determinaciones independientes ($n=3$) $\pm$ desvío estándar.

3.2.3. Propiedades emulsificantes de los concentrados del suero de soja y estabilidad de las emulsiones o/w frente a tratamientos de estrés tecnológico.

3.2.3.1. Distribución de tamaño de partícula y comportamiento interfacial en la interfase aceite/agua del concentrado obtenido a partir de suero de soja

En la Figura 75 se observa la DTP de las dispersiones acuosas del concentrado medido por SLS (Sección 3.1.21.1) y expresadas como porcentaje en volumen y superficie. En las distribuciones en volumen, que fueron bimodales a todos los pH, se observa una población minoritaria de partículas con diámetros inferiores a 2 μm y otra mayoritaria en un amplio rango extenso de diámetros (2 a 500 μm). Al expresar las distribuciones en superficie, se evidenció una población mayoritaria de partículas diámetros inferiores a 2 μm . Además, el 90% del área total, evaluada a través del $D_{S0,9}$, se distribuyó en partículas con diámetros inferiores a 36 μm , dando una idea en los tamaños que se distribuyen los tamaños en las dispersiones (Figura 75 b, c y f; Tabla 28).

De acuerdo con lo expuesto en la sección anterior, el CSS mostró una curva de turbidez en agua destilada con valores máximos a pH cercano a 4,0; adicionalmente, a este pH el potencial- ζ fue cercano a 0 mV (Figuras 69a y 70). Además, como el CSS mostró valores diferentes de S_p y S_{HC} en función del pH (Figura 71), el volumen y el área absoluta de las partículas insolubles en las dispersiones acuosas son diferentes a cada pH. Cabe resaltar, que la S_p a pH 4,0 fue mínima (Figura 71), por lo tanto, se ve incrementada la auto-asociación generando nuevas poblaciones de partículas insolubles de tamaño relativamente pequeño. Esto se hizo evidente en la reducción significativa en todos los diámetros promedio y percentiles ($D_{3,2}$, $D_{4,3}$, $D_{V0,9}$ y $D_{S0,9}$), en relación con los obtenidos a pH 3,0 y 5,0 ($p < 0,05$, Tabla 28). A pH 3,0, donde el valor de potencial- ζ fue positivo (Figura 70), el aporte de las partículas insolubles al área y volumen total en la DTP fue menor. Aunque las DTP en superficie fueron similares, los valores de $D_{S0,9}$ mostraron el orden creciente pH 4,0 < pH 5,0 < pH 3,0 ($p < 0,05$; Figura 75d-f y Tabla 28).

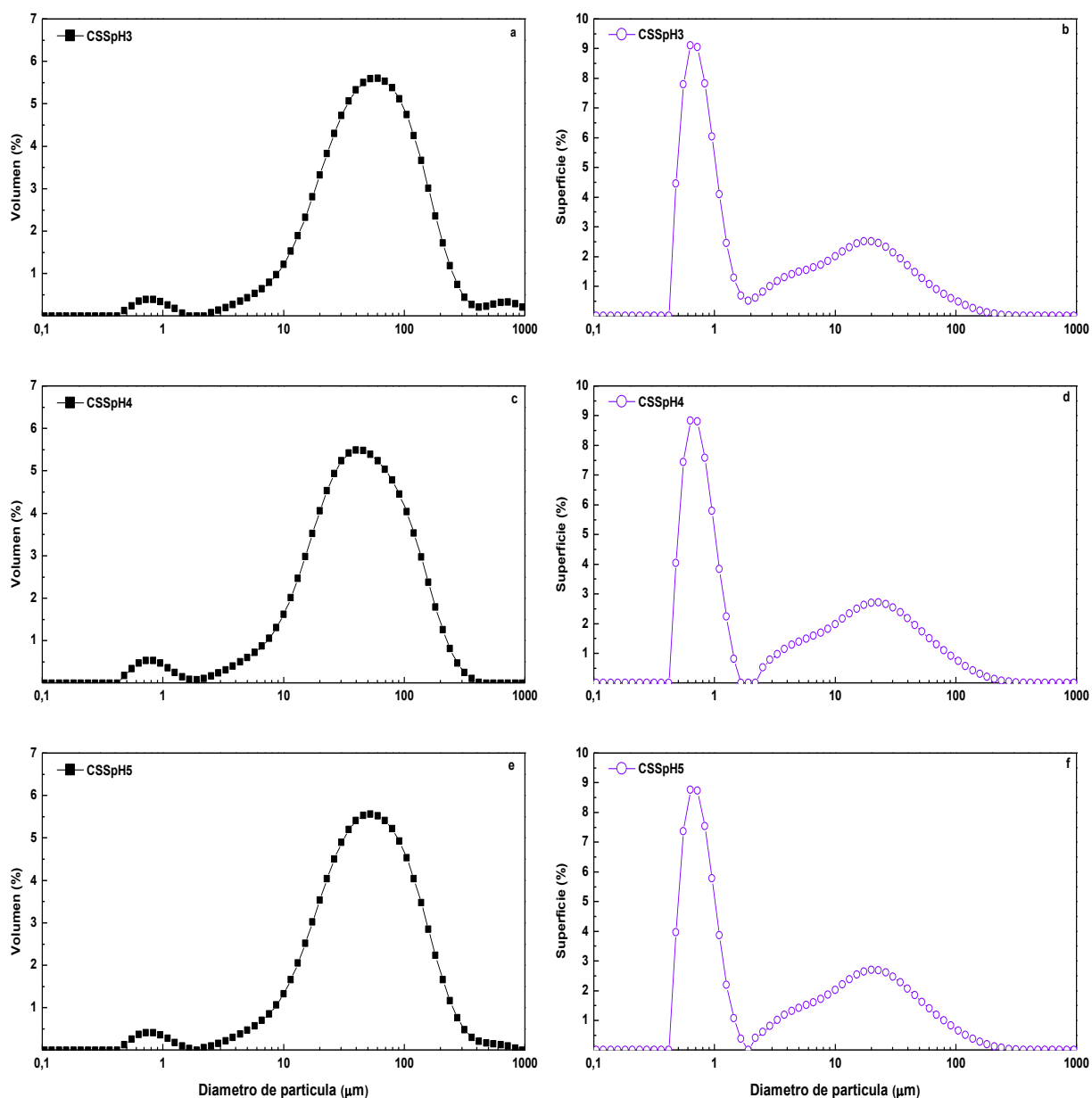


Figura 75: Distribución de tamaño de partícula de dispersiones acuosas de concentrado proteico de suero de soja obtenido por tratamiento térmico del suero de soja a presión reducida a 80 °C (CSS). En volumen: a) pH 3,0, b) pH 4,0 y c) pH 5,0. En superficie: d) pH 3,0, e) pH 4,0 y f) pH 5,0.

Tabla 28: Diámetros promedio de Sauter ($D_{3,2}$), de De Brouckere ($D_{4,3}$) y percentiles del 90% de la distribución tamaño de partícula en volumen ($D_{v0,9}$) y en superficie ($D_{s0,9}$) de las dispersiones acuosas de concentrado de suero de soja obtenido por tratamiento térmico del suero de soja a presión reducida a 80 °C (CSS).

Muestra	pH	$D_{3,2}$ (μm)	$D_{4,3}$ (μm)	$D_{v0,9}$ (μm)	$D_{s0,9}$ (μm)
CSS	3,0	$11,5 \pm 0,2^c$	$73,3 \pm 0,5^c$	$147,9 \pm 1,0^c$	$35,2 \pm 0,2^c$
	4,0	$6,9 \pm 0,1^a$	$53,7 \pm 0,3^a$	$120,6 \pm 0,7^a$	$13,7 \pm 0,1^a$
	5,0	$8,7 \pm 0,2^b$	$64,9 \pm 0,4^b$	$139,5 \pm 0,9^b$	$20,1 \pm 0,3^b$

Los valores de los diámetros promedios y los percentiles se expresaron como el promedio de tres determinaciones independientes ($n = 3$) $\pm$ desvío estándar. Los valores promedio en una misma columna seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher.

Para el CSS los valores $D_{3,2}$, $D_{4,3}$ y los percentiles $D_{v0,9}$ y $D_{s0,9}$ fueron inferiores a cada pH, respecto a CST80 (Tablas 15 y 28). Estos resultados se pueden atribuir a diferencias en el estado de agregación de los biopolímeros, debido a la diferente composición química y grado de desnaturalización de las proteínas en ambos concentrados, que fue analizado en la sección 3.2.2.1.

3.2.3.2. Comportamiento interfacial del concentrado de suero de soja en interfase agua/aceite

En la Tabla 29 se muestra la variación de la presión interfacial de equilibrio (π_i) con el pH para las dispersiones acuosas de CSS. El concentrado presentó la capacidad de incrementar la π_i a todos los pH evaluados (3,0 a 5,0) con valores en un rango entre $8,4 \pm 0,1$ y $9,2 \pm 0,2$ mN/m. Los valores de π_i exhibieron diferencias significativas entre los pH, registrando la mayor actividad interfacial a pH 4,0. De acuerdo con los ensayos de turbidez en agua (Figura 69a), el CSS presentó la mayor turbidez a valores de pH cercanos a 4,0. A pH 3,0 se observó una ligera disminución de π_i debido probablemente a la presencia de partículas de mayor tamaño y la repulsión electrostática (Tabla 28, Figura 70). Esta misma tendencia se observó en

CST80; no obstante, los valores de π_i fueron mayores a todos los pH, acorde con el mayor grado de desnaturalización de las proteínas del concentrado obtenido a partir del ST (Palazolo *et al.*, 2013).

Tabla 29: Variación de la presión interfacial de equilibrio (π_i) con el pH para las dispersiones preparadas con concentrados de suero de soja (CSS) y tofu (CST80) obtenidos bajo presión reducida a 80°C.

Presión interfacial π_i (mN/m)		
pH	CSS	CST80
3,0	$8,4 \pm 0,1^{aA}$	$8,9 \pm 0,1^{aB}$
4,0	$9,2 \pm 0,2^{cA}$	$9,7 \pm 0,1^{cB}$
5,0	$8,9 \pm 0,1^{bA}$	$9,4 \pm 0,2^{bB}$

Los valores de presión interfacial se expresaron como el promedio de tres mediciones independientes ($n = 3$) $\pm$ desvío estándar. Los valores promedio en una misma columna seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher. Los valores promedio en una misma fila seguidos de letras mayúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según lo determinado por la prueba de Fisher.

Además, los perfiles de viscosidad compleja interfacial (η^*) en función del tiempo se muestran en la Figura 76. Se puede observar una rápida adsorción en la interfase aceite/agua al inicio del ensayo a todos los pH ensayados, lo que puede indicar una adsorción y reordenamiento interfacial de los componentes presentes, formando una membrana interfacial con una correcta estructuración (Dickinson, 1992; Baldursdottir y Jorgensen, 2011). Al final del ensayo se observó mayores valores de η^* a pH 3,0 (Figura 76a), respecto a los demás pH. Como se ha mencionado en capítulos anteriores los valores de η^* son sensibles a las interacciones intermoleculares que ocurren a nivel interfacial entre los biopolímeros (Baldursdottir *et al.*, 2010). La mayor viscoelasticidad en las películas interfaciales a pH 3,0 se asociaría con una mayor contribución de partículas de mayor tamaño que estructurarían la membrana interfacial (Tabla 28).

Al comparar los módulos interfaciales entre CSS y CST80 se puede observar que a pH 5,0 no hay diferencia evidenciable entre los valores de η^* (Figura 76c). No obstante, a pH 3,0 y 4,0 los módulos interfaciales fueron significativamente superiores para CST80 (Figura 76a y

b), resultado que se puede asociar, con el mayor contenido y adsorción de agregados en la interfase para el CST80, formando una película interfacial con mayor viscoelasticidad, en concordancia con los mayores valores en los diámetros obtenidos en los ensayos de SLS (Tablas 15 y 28).

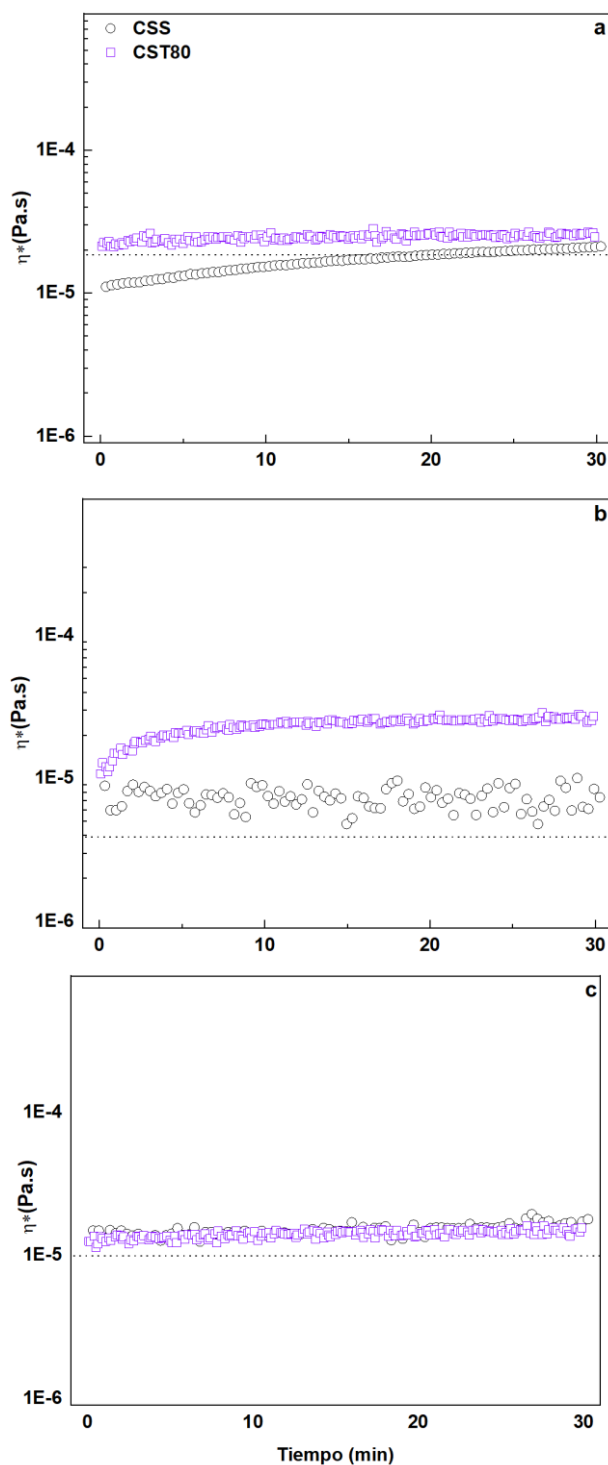


Figura 76: Perfiles de viscosidad compleja (η^*) en función del tiempo en la interfase aceite/agua para los concentrados de sueros de soja (CSS) y tofu (CST80) obtenidos a presión reducida a 80 °C ajustados a diferentes pH; a) pH 3,0, b) pH 4,0 y c) pH 5,0. Los ensayos fueron realizados a una concentración de proteína equivalente (1,0 % P/P). Los valores fueron expresados como la media de tres mediciones independientes ($n=3$) $\pm$ desviación estándar.

3.2.3.3. Caracterización de emulsiones iniciales

3.2.3.3.1. Distribución de tamaño de partícula y microestructura

En esta sección se evaluarán la DTP y la microestructura de las emulsiones iniciales. En la Figura 77 se muestran las distribuciones en volumen de las emulsiones sin y con sonicación, elaboradas con las dispersiones acuosas de CSS ajustadas en el rango de pH 3,0 a 5,0. A todos los pH las emulsiones exhibieron una DTP bimodal, con una población minoritaria de gotas en el orden de 1,0 μm y una población principal de gotas con diámetros superiores a 10 μm . Con el aumento del pH se registró un desplazamiento de la moda hacia mayor tamaño de partícula, resultados que se relacionan con el incremento significativo en los valores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ ($p < 0,05$, Tabla 30). Adicionalmente, al realizar el tratamiento de sonicación previo a las medidas de DTP, se observó el desplazamiento de las modas hacia un tamaño de partícula inferior, lo que indica la disociación o ruptura de los flóculos (Cabezas *et al.*, 2017; Colletti *et al.*, 2019; Porfiri *et al.*, 2016).

La presencia de flóculos se pudo corroborar en todas las emulsiones CSS por medio de microscopía óptica (Figura 77 a, b y c), no obstante, cualitativamente se pudo observar la presencia de gotas de mayor tamaño en las emulsiones ajustadas a pH 4,0 y 5,0 (Figura 77 b y c), siendo esto consistente con los mayores valores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ (Tabla 30). En las emulsiones ajustadas a pH 3,0 el GF fue significativamente inferior a los demás pH ($p < 0,05$, Tabla 30). La mayor actividad emulsificante del concentrado a pH 3,0 no se podría asociar a una mayor actividad interfacial, dado que se observaron valores de π_i más bajos que a pH 4,0 y 5,0 ($p < 0,05$, Tabla 29). Adicionalmente hay que recordar que, las condiciones en la que las proteínas se adsorben en la interfase durante la homogeneización son diferentes a las de los ensayos de tensiometría en la homogeneización, la adsorción interfacial es forzada por el flujo turbulento y la cavitación. Por lo tanto, en el concentrado a pH 3,0 (Tabla 28) pueden ser disociados a numerosas partículas de menor tamaño, promoviendo su rápida adsorción en la interfase, lo que reduce la re-coalescencia y el mecanismo de floculación por puenteo, y conduce a sistemas con menor tamaño de partícula y GF respecto a la preparadas a pH 4,0 y 5,0.

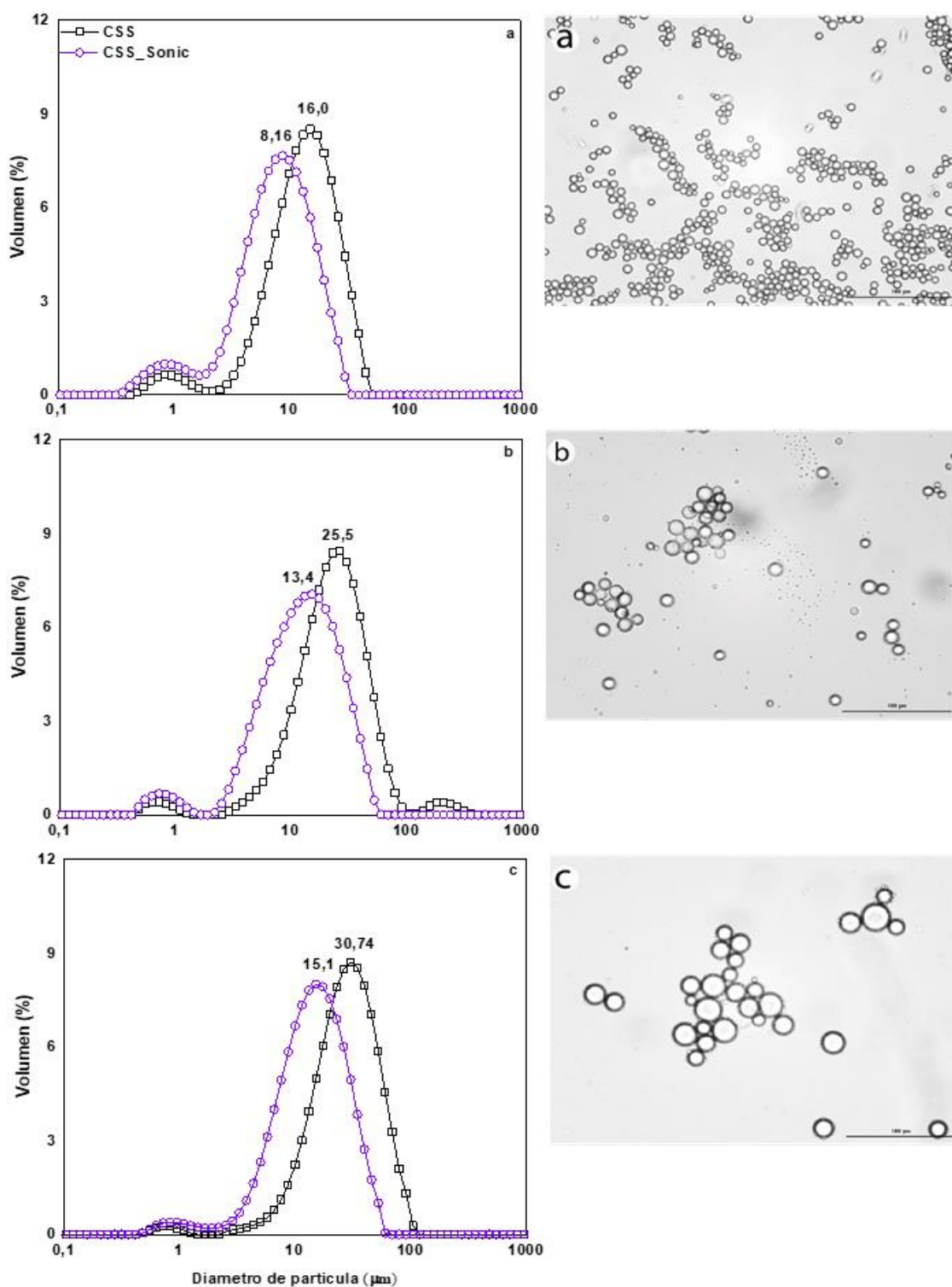


Figura 77: Distribuciones de tamaño de partícula medidas con y sin sonicación y microestructura de emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas (1,0% proteína P/P) de CSS: a) pH 3,0, b) pH 4,0 c) pH 5,0. Para el análisis de la microestructura (aumento: 200×), las emulsiones se diluyeron 1:20 V/V con agua destilada ajustada al mismo pH de las emulsiones. Barra: 100 μm.

Tabla 30: Diámetros promedios de Sauter ($D_{3,2}$) y De Brouckere ($D_{4,3}$) obtenidos a partir de las distribuciones de tamaño de partícula de emulsiones O/W medidas sin sonicación previa y preparadas con dispersiones acuosas de CSS y CST80 (1,0 % P/P de proteína, pH 3,0, 4,0 y 5,0). El grado de floculación (GF) se obtuvo a partir de los valores de $D_{4,3}$ sin y con sonicación (ecuación 52).

CSS							
pH	3,0	4,0	5,0	pH	3,0	4,0	5,0
$D_{4,3}$ (μm)	16,1 $\pm$ 0,2 bA	30,3 $\pm$ 0,3 ^{aB}	33,0 $\pm$ 0,6 ^{bC}	$D_{3,2}$ (μm)	7,5 $\pm$ 0,2 ^b A	12,8 $\pm$ 0,4 ^b B	16,6 $\pm$ 0,5 ^{bC}
GF(%)	38,8 $\pm$ 0,3 bA	45,9 $\pm$ 0,6 ^{bB}	48,5 $\pm$ 0,5 ^{aC}				
CST80							
pH	3,0	4,0	5,0	pH	3,0	4,0	5,0
$D_{4,3}$ (μm)	2,4 $\pm$ 0,1 ^a A	4,6 $\pm$ 0,1 ^{bB}	9,0 $\pm$ 0,2 ^{aC}	$D_{3,2}$ (μm)	1,7 $\pm$ 0,1 ^a A	5,1 $\pm$ 0,1 ^{aB}	6,5 $\pm$ 0,1 ^{aC}
GF(%)	9,4 $\pm$ 1,0 ^a A	43,4 $\pm$ 0,6 ^{aB}	62,5 $\pm$ 2,1 ^{bC}				

Los valores se expresaron como el promedio de tres mediciones independientes ($n = 3$) $\pm$ desvío estándar. Los valores promedio en una misma columna seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher. Los valores promedio en una misma fila seguidos de letras mayúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según lo determinado por la prueba de Fisher.

Un análisis comparativo entre las DTP de las emulsiones obtenidas con CSS y CST80, reveló que la moda y los valores $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$, para las emulsiones preparadas con CST80 fueron significativamente inferiores en todos los pH ($p < 0,05$, Tabla 30). Estos resultados se pueden relacionar con el mayor grado de desnaturalización de las proteínas en CST80, como consecuencia de los tratamientos hidrotérmicos durante la elaboración del tofu (Sobral *et al.*, 2018). Además, la presencia de partículas con mayor tamaño (Tabla 28) también influyen en la formación de emulsiones con diámetros de gota inferiores y menor grado de floculación.

3.2.3.3.2. Porcentaje de proteína adsorbida y concentración de proteína interfacial

La concentración de proteína interfacial (Γ) y el porcentaje de proteína adsorbida (% P_A), de las emulsiones elaboradas con CSS se presentan en la Tabla 31. A pH 3,0 las emulsiones exhibieron el mayor % P_A , asociado a la mayor adsorción de partículas insolubles, durante el proceso de homogeneización. Esto es consistente con el mayor aporte de partículas insolubles presentes en la dispersión acuosa a pH 3,0, corroborado a través del $D_{s0,9}$ (Tabla 28), lo cual incrementa el % P_A posterior a la homogeneización. En los ensayos de reología interfacial también se hace evidente este resultado, donde se observó el mayor valor de η^* a pH 3,0. (Figura 76).

Por otro lado, los valores de Γ también fueron significativamente mayores para las emulsiones formuladas a pH 3,0 ($p < 0,05$, Tabla 31), resultados que se relacionan con los menores valores de $D_{3,2}$ a este pH (Puppo *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011). Las emulsiones formuladas con CSS exhibieron la misma tendencia observada con CST80, donde con el ajuste de pH de 3,0 a 5,0 en las dispersiones acuosas, hubo una disminución de la Γ y el % P_A (Tabla 31). Comparativamente el % P_A y Γ fue significativamente mayor para CST80 a todos los pH ($p < 0,05$), resultado que se podría asociar al mayor contenido de partículas insolubles en la dispersión acuosa; además, las proteínas en CST80 están totalmente desnaturalizadas debido a los tratamientos térmicos realizados durante la obtención del tofu. En este contexto, al realizar un tratamiento térmico a las proteínas liofilizadas de suero de soja, se incrementó la concentración de proteína interfacial, lo cual se asoció con la desnaturalización e incremento de la hidrofobicidad superficial (Mitidieri y Wagner, 2002).

Tabla 31: Porcentaje de proteína adsorbida (% P_A) y concentración de proteína interfacial (Γ) de las emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas (1,0% proteína P/P , pH 3,0, 4,0 y 5,0) de concentrados de sueros de soja (CSS) y tofu (CST80) obtenidos por tratamiento térmico de los sueros a presión reducida a 80 °C.

Muestra	pH	Proteína adsorbida (% P_A)	Concentración de proteína interfacial (Γ , mg/m ²)
CSS	3,0	37,50 ± 0,20 ^{cA}	1,16 ± 0,11 ^{cA}
	4,0	36,10 ± 0,15 ^{bA}	0,70 ± 0,08 ^{bA}
	5,0	35,90 ± 0,17 ^{aA}	0,50 ± 0,10 ^{aA}
CST80	3,0	50,10 ± 0,50 ^{cB}	4,10 ± 0,20 ^{cB}
	4,0	46,40 ± 0,39 ^{bB}	2,59 ± 0,15 ^{bB}
	5,0	41,10 ± 0,21 ^{aB}	1,71 ± 0,09 ^{aB}

Los valores de % P_A y Γ se expresaron como el promedio de tres determinaciones independientes ($n = 3$) ± desvío estándar. Los valores promedio en una misma columna seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes para el mismo concentrado ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher. Las letras mayúsculas indican que las emulsiones elaboradas al mismo pH, pero con concentrados diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher.

3.2.3.3.3. Comportamiento de flujo

En la Figura 78 se muestra la variación de la viscosidad aparente en función de la velocidad de deformación para las emulsiones elaboradas con CSS en el rango de pH 3,0 a 5,0. La viscosidad de las emulsiones decreció al incrementar la velocidad de deformación, resultado que indica un comportamiento pseudoplástico. Por medio de los ensayos de micrografía óptica, se observó que todas las emulsiones exhiben la presencia de flóculos (Figura 77), por lo tanto, la caída acentuada en la viscosidad aparente a bajas velocidades de deformación se relaciona con la deformación y ruptura de los flóculos (Dickinson, 1994; McClements, 2016). Además, a altas velocidades de deformación, donde los flóculos se disociaron, los valores de viscosidad aparente a pH 4,0 fueron mayores que a pH 3,0 y 5,0. Este resultado no estaría relacionado con el tamaño de las gotas individuales de la emulsión sino con la mayor cantidad de partículas insolubles de menor tamaño en las dispersiones acuosas, que se evidenció a partir de una disminución de los diámetros promedio y percentiles (Tabla 28).

En la Tabla 32 se presentan los parámetros reológicos obtenidos al aplicar la ley de potencia ($R^2 \sim 1,0$) a las curvas de flujo. Se observa que los valores de K incrementaron

significativamente al ajustar el pH de 3,0 a 5,0 y al mismo tiempo los valores de n disminuyeron ($p < 0,05$). El incremento en la pseudoplasticidad (menor valor de n) de las emulsiones con el ajuste del pH, se relacionaría al incremento en el GF (Tabla 30), siendo muy evidente al cotejar el comportamiento de flujo en las emulsiones a pH 5,0 en relación a las obtenidas a pH 3,0 y 4,0.

Tabla 32: Constantes reológicas de la ley de potencia (K : índice de consistencia y n : índice de comportamiento de flujo) para las emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas (1,0% P/P de proteína, pH 3,0, 4,0 y 5,0) de concentrados de sueros de soja (CSS) y tofu (CST80) obtenidos por tratamiento térmico de los sueros a presión reducida a 80 °C.

CSS			
pH	3,0	4,0	5,0
K	0,02±0,003 ^{aA}	0,10±0,01 ^{aB}	0,13±0,05 ^{aB}
n	0,82±0,05 ^{aA}	0,60±0,09 ^{bA}	0,58±0,012 ^{bB}
CST80			
pH	3,0	4,0	5,0
K	0,01±0,007 ^{aA}	0,08±0,005 ^{aB}	0,12±0,008 ^{aC}
n	0,91±0,03 ^{bA}	0,66±0,06 ^{aB}	0,51±0,06 ^{aB}

Los valores se expresaron como el promedio de tres mediciones independientes ($n = 3$) $\pm$ desvío estándar. Los valores promedio en una misma columna seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher. Los valores promedio en una misma fila seguidos de letras mayúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según lo determinado por la prueba de Fisher.

En líneas generales, para las emulsiones elaboradas con CST80 los valores de n fueron mayores a todos los pH, en relación con los observados en las preparadas con CSS. Además, los valores promedio de K fueron mayores para las emulsiones formuladas con CSS, aunque estas diferencias no fueron significativas (Tabla 32). La diferencia en la pseudoplasticidad fue más marcada a pH 3,0, donde el GF% de la emulsión CST80 fue casi 4 veces mayor al observado en la preparada con CSS (Tabla 30).

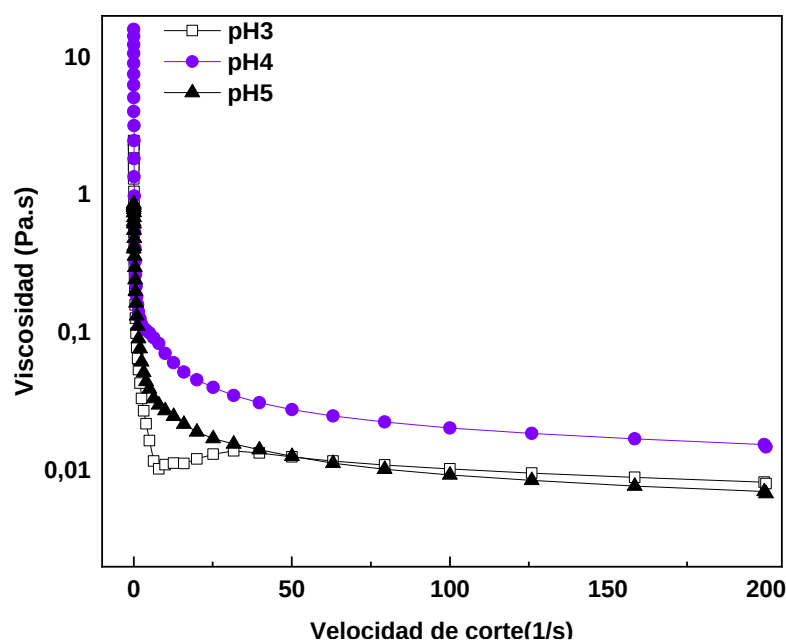


Figura 78: Comportamiento de flujo de emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas de concentrados de sueros de soja (CSS) (1,0% P_p de proteína, pH 3,0, 4,0 y 5,0).

3.2.3.4. Evaluación de la estabilidad de las emulsiones frente a los tratamientos tecnológicos

3.2.3.4.1. Congelación-descongelación

En la Figura 79 se presentan los diámetros promedio $D_{4,3}$ de las emulsiones iniciales y sometidas a congelación-descongelación preparadas con CSS. Se observó un incremento en los valores $D_{4,3}$ para todas las emulsiones luego del tratamiento de congelación-descongelación (Figura 79 a y b). Es importante señalar que en las emulsiones no se evidenció *oiling off* posterior a la descongelación y el grado de desestabilización fue ligeramente mayor a los reportados en trabajos anteriores, donde emulsiones elaboradas con aislados proteicos de soja y lactosuero, se almacenaron a temperaturas similares en ausencia de agentes crioprotectores (Cabezas *et al.*, 2019; Palazolo *et al.*, 2011, 2016; Zhu *et al.*, 2017). El incremento de $D_{4,3}$ sería consistente con una desestabilización por coalescencia en la emulsión. En las condiciones de almacenamiento las emulsiones elaboradas a pH 3,0 exhibieron el menor incremento relativo en los valores $D_{4,3}$ (Figura 80). Estos resultados se pueden relacionar a factores similares a los

mencionados para la desestabilización de las emulsiones preparadas con los concentrados del suero de tofu: i) a pH 3,0 las emulsiones presentaron valores más elevados de $\%P_A$ y Γ (Tabla 31) formando una membrana interfacial con mayor viscoelasticidad y por ende, mayor resistencia frente a la ruptura por la formación de hielo; ii) debido a la alta S_{CH} para CSS a pH 3,0 (Figura 71a) los polisacáridos solubles concentrados en la fase acuosa no congelada generan un impedimento estérico reduciendo el contacto entre las películas interfaciales de las gotas durante la congelación. Además, a pH 3,0 las emulsiones CSS iniciales presentaron menores valores de $D_{4,3}$ y de GF (Tabla 30), por lo tanto, las gotas más pequeñas tienen la capacidad de ubicarse en un volumen más reducido en la fase acuosa no congelada, disminuyendo su probabilidad a sufrir ruptura por el efecto mecánico de la presencia de cristales de hielo (Ghosh y Coupland, 2008; Gu *et al.*, 2007; Palazolo *et al.*, 2011).

Las diferencias de estabilidad frente al almacenamiento en congelación entre CSS y CST80 fue muy evidente, presentando una mayor desestabilización las emulsiones formuladas con CSS a todos los pH (Figuras 79 y 80). Estos resultados pueden asociarse a una mayor $\%P_A$ y Γ para las emulsiones de CST80, promoviendo la formación de membranas interfaciales con mayor viscoelasticidad (Tabla 31; Figura 76) y por lo tanto, menor desestabilización por coalescencia durante la congelación-descongelación. Adicionalmente, los valores $D_{4,3}$ iniciales fueron notablemente inferiores en las emulsiones CST80 (Tabla 30); como se mencionó previamente, las gotas de menor tamaño se pueden acomodar más eficientemente en la fase acuosa no congelada durante el almacenamiento a temperaturas bajo cero (Tabla 30). Además, CST80 está constituido por proteínas con mayor estado de agregación y por ende menor S_P (Figuras 36 y 71); como se mencionó en un capítulo anterior, los agregados no adsorbidos pueden contribuir a la estabilización de emulsiones en un proceso de congelación-descongelación (Ghosh y Coupland, 2008; Palazolo *et al.*, 2011).

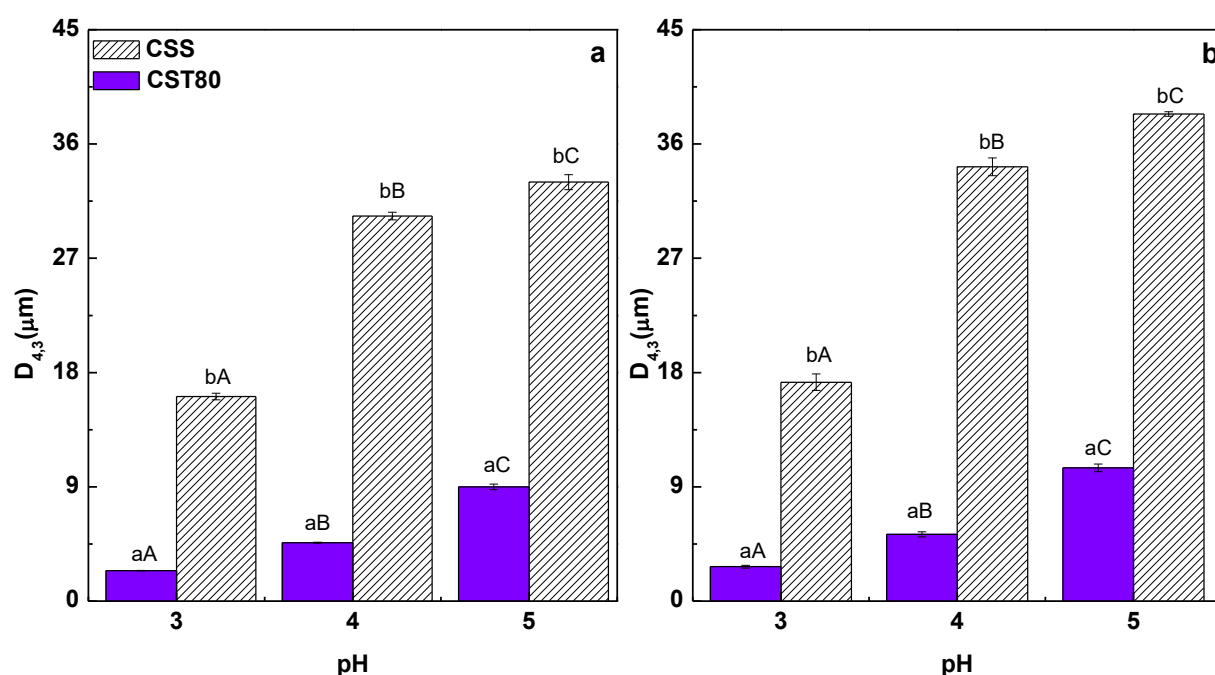


Figura 79: Diámetros promedios $D_{4,3}$ de las emulsiones CSS y CST80: a) iniciales y b) sometidas a congelación-descongelación. Los valores se expresaron como el promedio de tres mediciones independientes ($n = 3$) $\pm$ desvío estándar. En la parte superior de las barras, las letras mayúsculas diferentes indican que las emulsiones de una misma muestra elaboradas a diferentes pH son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher. Las letras minúsculas indican que las emulsiones elaboradas al mismo pH, pero con concentrados diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher.

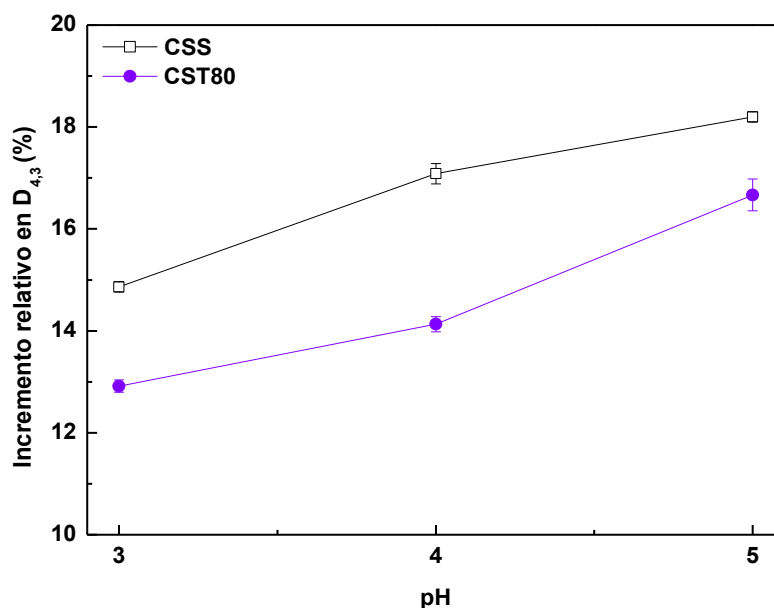


Figura 80: Incremento relativo (ecuación 51) en los diámetros promedio $D_{4,3}$ de las emulsiones CSS y CST80, elaboradas en el rango de pH 3,0 a 5,0, sometidas a congelación-descongelación, respecto a las emulsiones iniciales.

3.2.3.4.2. Agitación mecánica

En la Figura 81 se presentan los diámetros promedio $D_{4,3}$ de las emulsiones sometidas a agitación mecánica controlada durante 40 minutos. Se evidenció un incremento significativo de los valores $D_{4,3}$ en función del tiempo de agitación en todas las emulsiones preparadas con CSS, acorde a una desestabilización por coalescencia. Además, al detener la agitación al final de ensayo se observó desestabilización por cremado por el incremento del tamaño de las gotas. No obstante, la estabilidad para las emulsiones ajustadas a pH 3,0 fue ligeramente mayor durante los primeros 20 minutos del ensayo (Figura 81a). Las dispersiones acuosas del CSS a pH 4,0 y 5,0 exhibieron valores de potencial ζ negativos, pero a pH 4,0 fue cercano a cero (Figura 70) por su cercanía al punto isoeléctrico de las proteínas de reserva y de suero de soja (Sorgentini y Wagner 1999). Por lo tanto, la E_C estaría asociada al incremento en las interacciones hidrofóbicas, aumentando la probabilidad de ruptura de las películas interfaciales durante la agitación. En concordancia con los bajos valores de η^* para las dispersiones acuosas de CSS a pH 4,0 y 5,0, la menor estabilidad de las emulsiones a estos pH también se asociaría a la formación de membranas interfaciales con menor viscoelasticidad y por ende,

menor resistencia a la ruptura durante la agitación. Además, el %P_A y Γ fue significativamente inferior a los pH mencionados (Tabla 31), siendo este un factor que reduce la estabilidad de la resistencia de la película interfacial a la ruptura luego de un evento de colisión (Britten y Giroux, 1999; Mitidieri y Wagner, 2002; Palazolo, 2006). Además, de los factores que operan a nivel interfacial, el mayor tamaño de las partículas y GF de las emulsiones a pH 4,0 y 5,0 (Tabla 30) contribuyen, al mismo tiempo, a incrementar la E_C y, por ende, la susceptibilidad a la desestabilización.

En la Figura 81 también se puede observar que las emulsiones preparadas con CST80 a todos pH, exhibieron un menor incremento de los valores D_{4,3} durante los 40 minutos del ensayo. Este resultado fue consistente con los menores tamaños de partícula iniciales (Tabla 30) y con mayores valores de %P_A, Γ y η^* observados en las emulsiones CST80 (Figura 76, Tabla 31. Todos los factores mencionados operan simultáneamente, explicando los resultados obtenidos.

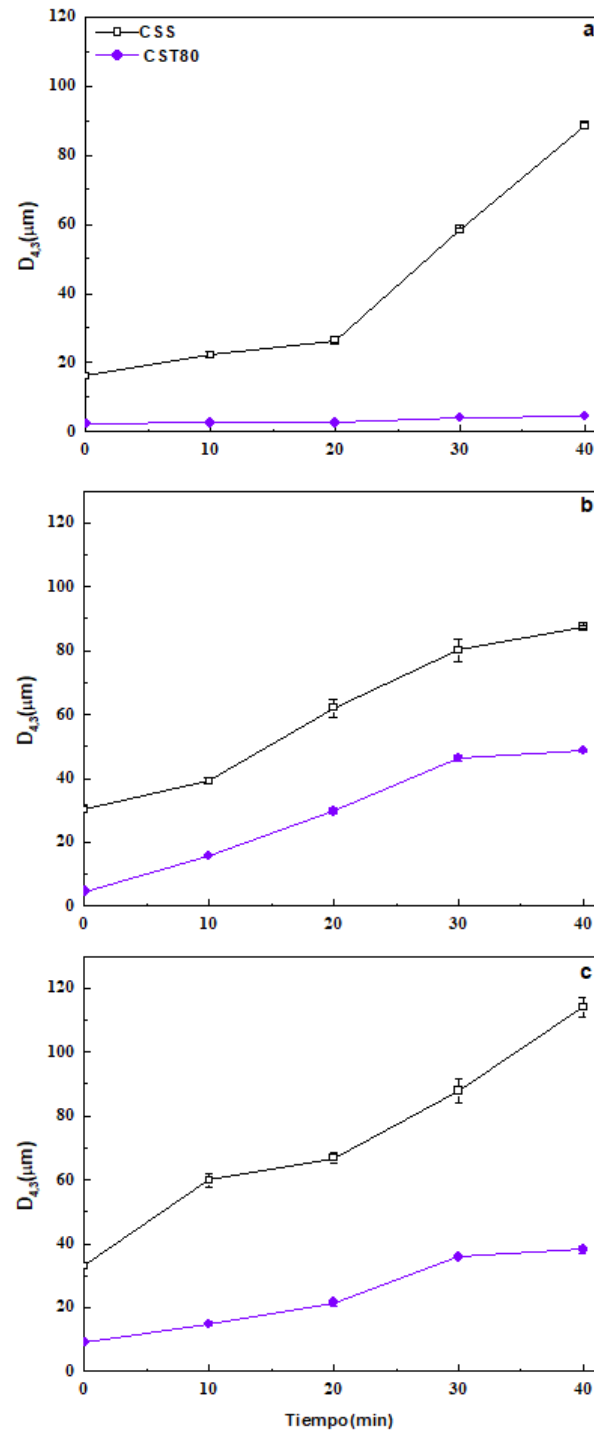


Figura 81: Efecto de la agitación orbital (275 r.p.m., 25 °C) sobre los diámetros promedio $D_{4,3}$ de emulsiones elaboradas con concentrados de sueros de soja (CSS) y tofu (CST80) bajo presión reducida a 80°C y ajustadas a pH entre 3,0 a 5,0. **a)** pH 3,0, **b)** pH 4,0 y **c)** pH 5,0.

3.2.4. Interacción entre concentrado proteico de suero de soja y polisacárido soluble de soja

Los complejos entre proteínas y polisacáridos podrían combinar las excelentes propiedades de emulsificación de las proteínas con el efecto estabilizador de los polisacáridos (Shepherd *et al.*, 2000). Se ha demostrado que los sistemas mixtos proteínas-polisacáridos combinan las propiedades hidrofóbicas de una proteína con las propiedades hidrofílicas del polisacárido, el cual está altamente solvatado en la fase acuosa (Dickinson y Galazka 1991). La formación del complejo proteína-polisacárido en la superficie de la gota de una emulsión puede mejorar su estabilidad frente a los tratamientos de estrés tecnológico.

3.2.4.1. Dependencia de la turbidez y el potencial- ζ con el pH

Para comprender el comportamiento de las interacciones entre el CSS y el SSPS en emulsiones y en la interfase aceite/agua es fundamental conocer las interacciones que existen en solución. Por lo tanto, se estudió el efecto del pH sobre la turbidez de las dispersiones acuosas de los sistemas mixtos CSS/SSPS (0,1 % P/P, relación másica 1:1) y de las dispersiones acuosas individuales de CSS y SSPS (0,1 % P/P), en presencia de agua destilada, urea 6,0 M y urea 6,0 M+ DTT 30 mM (Figura 82). En agua destilada el CSS exhibió un comportamiento similar al observado en la Figura 69a, hubo un incremento de la turbidez al descender el pH, obteniendo valores máximos a pH 2,6 y 3,7; con el posterior agregado de solución de HCl hasta pH 2,0, se evidenció una ligera disminución en los valores de turbidez (Figura 82a). El CSS presentó una carga cercana a cero a pH entre 3,0 y 4,0 (Figura 70), resultado que coincide con el mayor grado de asociación que exhibe la muestra en este rango de pH y estaría cercano al punto isoeléctrico de las proteínas del suero de soja (~pH 4,5) (Song *et al.*, 2011). Además, la presencia de polisacáridos ácidos en el CSS aportaría una carga que promueva una auto-asociación, debido a que en condiciones específicas el pH de agregación puede coincidir con el pKa (3,0) de los restos de ácido galacturónico (Nakamura *et al.*, 2001; Ray y Rousseau, 2013; Porfiri y Wagner, 2018).

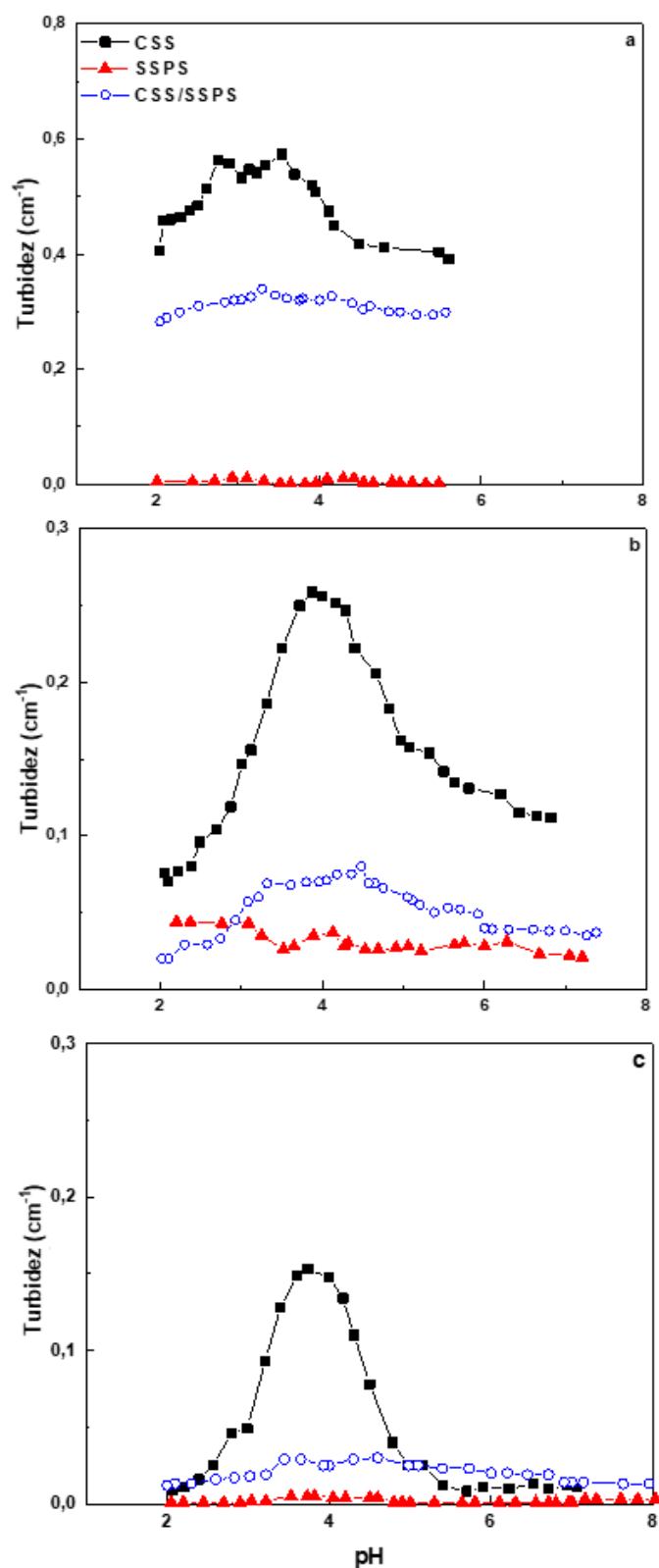


Figura 82: Efecto del pH sobre la turbidez de dispersiones acuosas (0,1 % P/P) de concentrados de sueros de soja (CSS), polisacárido soluble de soja (SSPS) y CSS/SSPS (relación másica 1:1): a) en agua destilada; b) en solución de urea 6,0 M; c) en solución de urea 6,0 M + ditiotreitól (DTT, 30 mM).

Los valores de turbidez para el SSPS fueron cercanos a cero en todo el rango de pH evaluado (2,0 a 7,0) (Figura 82a). Este resultado similar al obtenido previamente por Cabezas *et al* (2019) y es atribuible a la alta solubilidad en agua que exhibe el polisacárido (Furuta y Maeda 1999). Además, el SSPS no sufre cambios conformacionales con la variación del pH (Chivero *et al.*, 2014). En la dispersión acuosa mixta CSS/SSPS se registró una disminución en los valores de turbidez a todos los pH evaluados respecto a la de CSS (Figura 82), lo cual se puede atribuir a la interacción CSS/SSPS. Como se mencionó previamente en la sección 3.2.2.5, la presencia del SSPS disminuyó la auto-asociación de las moléculas de proteínas y la formación de agregados de gran tamaño. Estos resultados concuerdan con estudios realizados en dispersiones acuosas mixtas de proteínas de suero lácteo (WPI) y SSPS (Cabezas *et al.*, 2019). El SSPS tiene una fracción proteica asociada, la cual se mantiene soluble y poco agregada en solución, debido a las interacciones electrostáticas y repulsiones de carácter estérico, promovidas por la presencia de ramificaciones y de grupos funcionales cargados negativamente en el polisacárido (Nakamura *et al.*, 2004b).

En los ensayos de la variación de la turbidez en presencia de urea 6,0 M (Figura 82b), el CSS exhibió un marcado descenso en los valores de turbidez, lo cual se relaciona con la disociación de los agregados presentes por la acción del agente caotrópico (Zangi *et al.*, 2009). Además, se observó un valor máximo de turbidez a pH 4,0 y un descenso sostenido al disminuir el pH hasta 2,0, por lo que el efecto de disociación de la urea tendría un mayor impacto en los polisacáridos. Finalmente, en presencia de DTT la turbidez disminuyó para CSS, asociándose a una disociación adicional generada por la reducción de los puentes disulfuro (Figuras 82b y c). La turbidez del SSPS en presencia de urea 6,0 M y DTT exhibió valores cercanos a cero a todos los pH evaluados (2,0 a 7,0) (Figura 82b y c), lo que sería consistente con la baja tendencia a asociarse de las moléculas de polisacáridos y por ende la escasa presencia de partículas agregadas en el SSPS. Para las dispersiones mixtas de CSS/SSPS en los ensayos con urea y DTT, los valores de turbidez disminuyeron respecto a los obtenidos con el CSS, siendo más cercanos a los obtenidos con las dispersiones acuosa de SSPS (Figura 82b y c). Estos resultados podrían ser debidos a la carga que aporta el polisacárido evitando la auto-asociación por un efecto electrostático y estérico (Cabezas *et al.*, 2019; Nakamura *et al.*, 2004).

El potencial- ζ fue negativo para todas las dispersiones acuosas a pH isoiónico; al ajustar el pH a 3,0 disminuyó a valores más cercanos a cero (Tabla 33), no obstante, para CSS a pH 3,0 se observaron valores ligeramente positivos. Estos resultados son coincidentes con

reportados en un trabajo anterior por Ray y Rousseau (2013), donde dispersiones acuosas de proteínas aisladas del suero de soja, SSPS y los sistemas mixtos, tomaron valores de potencial- ζ negativos en un rango de pH 4,0 a 7,0 y valores cercanos a cero en el rango de pH 2,0 a 4,0.

Tabla 33: Potencial- ζ en dispersiones acuosas (0,1 % P/P) de concentrado de suero de soja (CSS), polisacárido soluble de soja (SSPS) y en sistemas mixtos CSS/SSPS (relación másica 1:1).

Potencial- ζ (mV)		
pH isoiónico		
CSS	SSPS	CSS/SSPS
$-18,50 \pm 0,50^{bA}$	$-24,47^{bB} \pm 0,35^{bB}$	$-22,40 \pm 0,40^{bC}$
pH 3,0		
CSS	SSPS	CSS/SSPS
$1,53 \pm 0,12^{aB}$	$-0,43 \pm 0,10^{aA}$	$-2,01 \pm 0,08^{cC}$

Los valores de potencial- ζ se expresaron como el promedio de tres mediciones independientes ($n = 3$) $\pm$ desviación estándar. Los valores promedio en una misma columna seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher. Los valores promedio en una misma fila seguidos de letras mayúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según lo determinado por la prueba de Fisher.

Para el sistema mixto CSS/SSPS el potencial- ζ al pH isoiónico registró una carga negativa de $-22,40 \pm 0,40$ mV, cercana al valor de la dispersión individual de SSPS a ese mismo pH. Según Wu *et al.* (2012), la interacción entre CSS/SSPS es débil a pH cercanos a la neutralidad o pH alcalinos por la repulsión electrostática, debido a que ambos biopolímeros tienen carga neta negativa (Tabla 33). La dispersión de CSS/SSPS a pH 3,0 presentó un valor de potencial- ζ ligeramente más negativo ($-2,01$ mV) que las dispersiones individuales de CSS y SSPS. Posiblemente el SSPS puede asociarse al CSS debido a la atracción electrostática, formando un complejo proteína-polisacárido promovido por la neutralización de las cargas de los grupos catiónicos en las moléculas de proteínas por los grupos aniónicos del SSPS, disminuyendo el potencial- ζ en el complejo CSS/SSPS. Además, la complejación se corroboró por medio de los ensayos de turbidez (Figura 82) donde se observó una disminución del grado de agregación de las proteínas del CSS debido a la interacción con el polisacárido. Otros autores han reportado la complejación entre proteínas del suero lácteo y de soja con SSPS a pH

3,0 obteniendo resultados similares a los obtenidos en este trabajo (Ray y Rousseau, 2013; Xu y Liu, 2016; Cabezas *et al.*, 2019).

3.2.4.2. Tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz (DLS)

En esta sección se empleó la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) para evaluar en forma complementaria a los ensayos de turbidez, las interacciones entre el CSS y el SSPS. Si ambos biopolímeros no interaccionaran entre sí, el tamaño de las partículas característico del CSS y del SSPS no se modificaría al preparar una dispersión mixta CSS/SSPS. Por lo tanto, la variación en las DTP sería consistente con una interacción molecular. En trabajos previos se ha empleado esta técnica para corroborar las interacciones del SSPS con proteínas de origen vegetal y animal, además de la interacción entre proteínas (Ray y Rousseau, 2013; Xu y Liu, 2016; Morales *et al.*, 2017; Cabezas *et al.*, 2019).

La DTP por intensidad de las dispersiones acuosas de CSS (0,1% P/P) se determinó a pH isoiónico y a pH 3,0 (Figura 83). A pH isoiónico, se observaron dos picos con modas a 52,3 y 280,1 nm. En cambio, al ajustar a pH 3,0 se observó una distribución monomodal con un pico máximo a 288,4 nm. Debido a la carga neta que tiene el CSS a pH 3,0 (Tabla 33), se incrementó el grado de asociación de los biopolímeros, contribuyendo al aumento observado en el tamaño de las partículas. Al analizar los resultados mediante la distribución de volumen (Figura 83b), se encontró que a pH isoiónico hay una población mayoritaria (o principal) con moda a 22,8 nm. En cambio, en la dispersión ajustada a pH 3,0 se confirmó la asociación de los biopolímeros por el desplazamiento de la población hacia mayores tamaños de partícula.

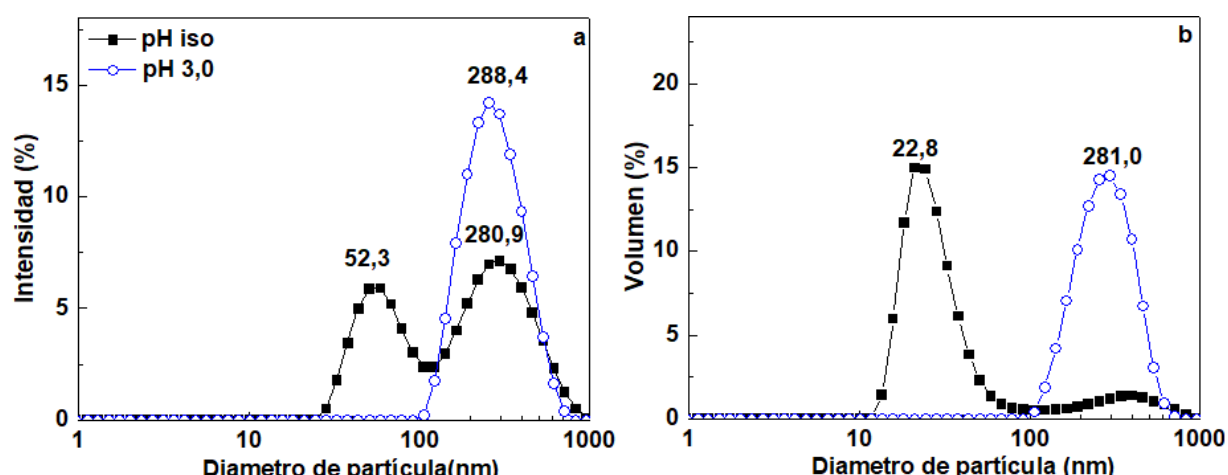


Figura 83: Distribución de tamaño de partícula por intensidad (a) y volumen (b) del concentrado proteico de suero de soja (CSS, 0,1 % P/P), a pH isoiónico y ajustada a pH 3,0.

La distribución en intensidad para las dispersiones acuosas de SSPS (0,1% P/P) a pH isoiónico y a pH 3,0 se presenta en la figura 84. La distribución a pH 5,5 exhibió un alto grado de polidispersión, con tres picos con modas de 18,9, 91,6 y 522,9 nm. La distribución en volumen (Figura 84b) confirmó que el polisacárido tiene partículas en el rango 100–1000 nm pero en menor porcentaje que las partículas de menor tamaño, presumiblemente debido a alta solubilidad en medio acuoso (Chivero *et al.*, 2014). Sin embargo, las distribuciones en intensidad y volumen de la dispersión ajustada a pH 3,0 evidenciaron partículas la presencia de partículas de mayor tamaño. Aunque en este trabajo no se muestran los valores de diámetro hidrodinámico (D_z) del SSPS, en trabajos previos se han reportado valores similares a los obtenidos en este trabajo a pH neutro y a pH 3,0 (Nakamura *et al.*, 2006a; Xu y Liu, 2016; Cabezas *et al.*, 2019)

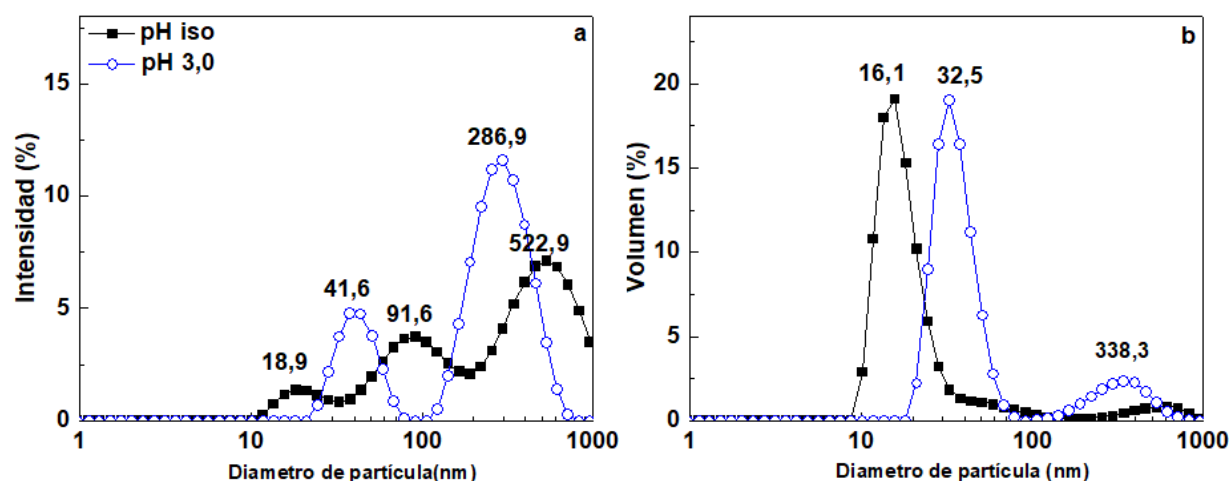


Figura 84: Distribución de tamaño de partícula por intensidad (a) y volumen (b) de dispersiones acuosas de polisacárido soluble de soja (SSPS, 0,1 % P/P), a pH isoiónico y pH 3,0.

La interacción entre el CSS y el SSPS en dispersión acuosa (relación másica 1:1) se estudió a temperatura ambiente (25 °C), a pH isoiónico y a pH 3,0 (Figura 85). A pH 5,5 la distribución en intensidad fue bimodal, con dos poblaciones con modas de 32,5 y 248,0 nm. El mismo comportamiento fue observado en CSS (Figura 83); sin embargo, en el sistema mixto la presencia de SSPS redujo levemente el tamaño de las partículas en las dos poblaciones. Al analizar la distribución en volumen, se evidenció la desaparición casi completa de la población observada a 247,9 nm en la distribución en intensidad. Además, la distribución exhibió una población mayoritaria, cuya moda (24,3 nm) es similar a la observada en CSS (Figura 83). Este resultado estaría indicando una débil interacción CSS/SSPS a pH 5,5, por la carga neta negativa de ambos biopolímeros, dificultando la complejación o asociación en la dispersión (Yin *et al.*, 2012; Xu y Liu, 2016).

En la dispersión CSS/SSPS ajustada a pH 3,0 se observó una distribución en intensidad de carácter monomodal con un pico a 160,4 nm (Figura 85). En cambio, la distribución en volumen fue bimodal con picos a 67,1 nm y a 193,2 nm. A pH 3,0 el SSPS y el CSS exhibieron una carga neta opuesta (Tabla 33), promoviendo una interacción electrostática. Además, el SSPS es un polisacárido ramificado y al interaccionar con las proteínas del CSS, reduce el tamaño de partículas de los agregados debido a un efecto estérico. Por ende, los cambios en la DTP en intensidad y en volumen indicarían una asociación entre ambos biopolímeros al pH mencionado. Estos resultados fueron similares a los informados por Ray y Rousseau (2013),

donde la presencia de SSPS en las dispersiones mixtas con proteína aislada de suero de soja en medio ácido disminuyó el tamaño de las partículas en la dispersiones de CSS.

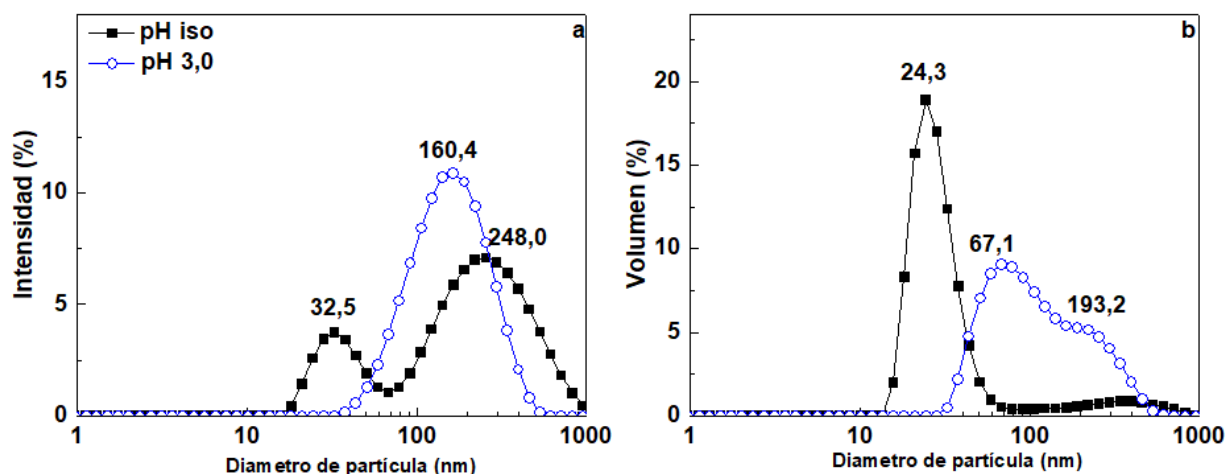


Figura 85: Distribución de tamaño de partícula por intensidad (a) y volumen (b) del sistema mixto CSS/SSPS relación másica 1:1 (0,1 % P/P), a pH isoiónico y pH 3,0.

3.2.4.3. Comportamiento interfacial en interfase aceite/agua

En esta sección se evaluaron las propiedades interfaciales en la interfase aceite/agua del CSS, SSPS y el sistema mixto CSS/SSPS (relación másica 1:1). Los valores de presión interfacial de equilibrio (π_i) mostraron claramente el siguiente orden decreciente: CSS/SSPS > SSPS > CSS (Tabla 34, $p < 0,05$), indicando que la complejación entre ambos biopolímeros genera especies con una mayor actividad interfacial que los componentes individuales. Además, se debe considerar que las dispersiones CSS/SSPS tienen una concentración total de biopolímero más alta que las preparadas con CSS y SSPS, factor que podría contribuir a un aumento de π_i . El incremento de la actividad interfacial del WPI por complejación con SSPS a pH 3,0 también fue observado previamente por Cabezas *et al* (2019).

Tabla 34: Presión interfacial de equilibrio del sistema mixto CSS/SSPS y de las dispersiones individuales de CSS y de SSPS ajustadas a pH 3,0.

Presión interfacial (π_i)			
pH	CSS	SSPS	CSS/SSPS
3,0	8,4 $\pm$ 0,1 ^a	9,0 ^b $\pm$ 0,1 ^b	9,35 ^c $\pm$ 0,1 ^c

Los valores de presión interfacial se expresaron como el promedio de tres determinaciones independientes ($n = 3$) $\pm$ desvío estándar. Los valores promedio en una misma fila seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher.

Además, se estudió la evolución de la viscosidad compleja interfacial (η^*) en función del tiempo y en la interfase aceite/agua para los sistemas mencionados a dos concentraciones diferentes (2,0 y 3,0% P/P) y a pH 3,0; los resultados se muestran en la Figura 86. A 2,0% P/P , los valores de η^* del CSS se incrementaron rápidamente desde el inicio del ensayo acorde con una rápida adsorción y reordenamiento interfacial. En cambio, en el SSPS la viscosidad compleja interfacial se incrementó más lentamente, mostrando además un menor valor al final del ensayo (Figura 86a). La película formada con el sistema mixto, con una concentración total de biopolímero mayor que la de las dispersiones individuales (2,0% CSS + 2,0% SSPS), presentó durante todo el ensayo un comportamiento similar al del CSS (Figura 86a), lo que indica que la viscoelasticidad de la película interfacial está gobernada por el concentrado proteico. Como se mencionó en los capítulos anteriores, la viscoelasticidad del film interfacial depende de la intensidad de las interacciones atractivas que se establecen entre las especies adsorbidas en la interfase (Baldursdottir *et al.*, 2010). La fracción proteica asociada al SSPS, con mayor afinidad por la interfase, permite el anclaje promoviendo su adsorción y los grupos funcionales hidrofílicos de la cadena principal y de las ramificaciones se ubican en la fase acuosa, generando una repulsión estérica entre los biopolímeros adsorbidos. Esto podría contribuir a disminuir la viscoelasticidad de la película interfacial (Nakamura *et al.*, 2006a). En cambio, para el CSS y el sistema mixto, la viscoelasticidad de la película interfacial es mayor debido a la contribución de las proteínas del CSS presentes en las dispersiones. De hecho, en este trabajo se resaltó la contribución de la adsorción de partículas insolubles de mayor tamaño del CSS a pH 3,0 a la viscoelasticidad del film interfacial, acorde a con los valores observados de $D_{s0,9}$ (Tabla 28).

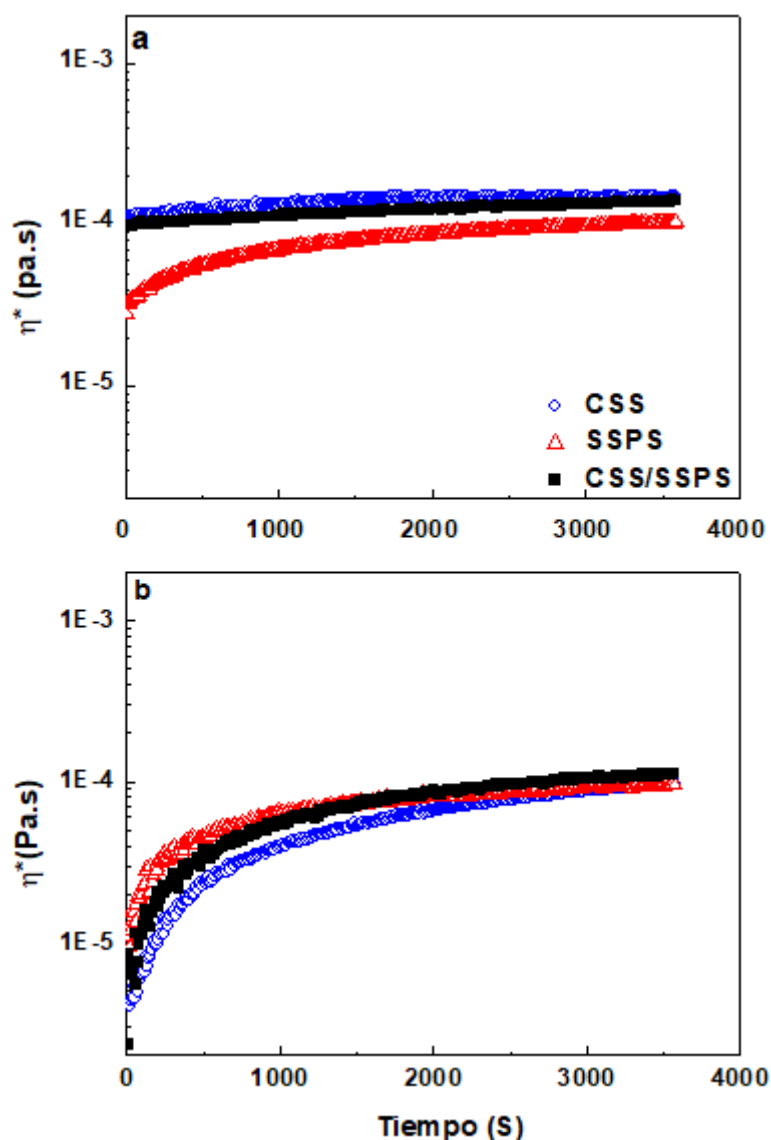


Figura 86. Perfiles interfaciales de viscosidad compleja (η^*) en función del tiempo, en la interfase aceite/agua para las dispersiones acuosas del concentrado de suero de soja (CSS), del polisacárido soluble de soja (SSPS) y del sistema mixto CSS/SSPS ajustadas a pH 3,0: a) concentración de muestra 2,0% P/P , b) concentración de muestra 3,0% P/P . Los valores fueron expresados como el promedio de tres mediciones independientes ($n=3$) $\pm$ desvío estándar.

Los ensayos realizados con las dispersiones al 3,0% P/P , se presentan en la figura 86b, donde se observó un incremento más lento de η^* en relación con los observados en los ensayos con dispersiones acuosas de menor concentración. Además, no se registraron diferencias significativas en la viscosidad compleja interfacial del CSS, SSPS y del sistema mixto

CSS/SSPS al final del ensayo. Estos resultados estarían indicando que, debido a la realización del ensayo con dispersiones concentradas de las muestras, la interfase está saturada de biopolímeros, en la cual se forma una multicapa de proteínas y polisacáridos, estando las moléculas de proteína adsorbidas en la capa interna y en la capa externa polisacáridos aportando un efecto estérico (Dickinson, 2015; Semenova, 2017).

3.2.4.4. Caracterización de las emulsiones iniciales

3.2.4.4.1. Distribución de tamaño de partícula y microestructura

En la Figura 87 se muestra la DTP en volumen para las emulsiones iniciales elaboradas con dispersiones acuosas de CSS y SSPS al 2,0 y 3,0 % P/P de muestra. Las emulsiones CSS al 2,0% presentaron una DTP bimodal con una población de gotas minoritaria con diámetros en el orden de 1,0 μm y una población predominante con gotas de diámetros superiores a 5,0 μm (Figura 87a). Las emulsiones elaboradas con el concentrado al 3,0%, mostraron una DTP similar, aunque con valores levemente mayores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ respecto a las formuladas a la menor concentración ($p < 0,05$, Tabla 35). Por medio de los ensayos de microscopía óptica se pudo observar cualitativamente la presencia de flóculos en las emulsiones CSS, siendo consistente con los altos valores de GF (Figura 87; Tabla 35).

La DTP para las emulsiones elaboradas con SSPS al 2,0% presentó dos poblaciones bien definidas; la primera con gotas con diámetros entre 0,5 y 2,0 μm y la segunda con gotas con diámetros de 5 a 45 μm (Figura 87b). Las emulsiones formuladas con SSPS al 3,0 % también fueron de carácter bimodal, pero con una población minoritaria compuesta por gotas con diámetros entre 0,5 y 2,5 μm y una población mayoritaria compuesta por gotas con diámetros entre 5,0 y 10 μm (Figura 87b). Los valores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ de las emulsiones SSPS 3,0% fueron significativamente inferiores a los observados para las preparadas a la menor concentración ($p < 0,05$, Tabla 35). En las micrografías se observa de forma cualitativa que las emulsiones elaboradas con SSPS tienen una baja tendencia a la floculación y gotas de tamaño pequeño, acorde a los valores de $D_{4,3}$, $D_{3,2}$ y GF (Tabla 35). Por lo tanto, a concentración equivalente de muestra, el SSPS tiene mejor capacidad como emulsificante que el CSS. En estudios previos se ha empleado el SSPS para la elaboración y estabilización de emulsiones

O/W a pH 3,0, presentando comportamientos similares a los observados en este trabajo, con diámetros de gota comprendidos entre 0,1 y 10 μm (Nakamura *et al.*, 2004a; Nakamura *et al.*, 2006b). Las proteínas presentes en el SSPS juegan un papel fundamental en las propiedades emulsificantes, adsorbiéndose rápidamente en la interfase aceite/agua durante la homogenización y favoreciendo el anclaje de los polisacáridos, formando una película interfacial gruesa y altamente hidratada (Nakamura *et al.*, 2004a). Por lo tanto, al emplear SSPS como único agente emulsificante, las gotas recién formadas se estabilizan por impedimento estérico otorgado por la cadena ramificada del polisacárido. Esto evita la floculación y la re-coalescencia durante la homogeneización.

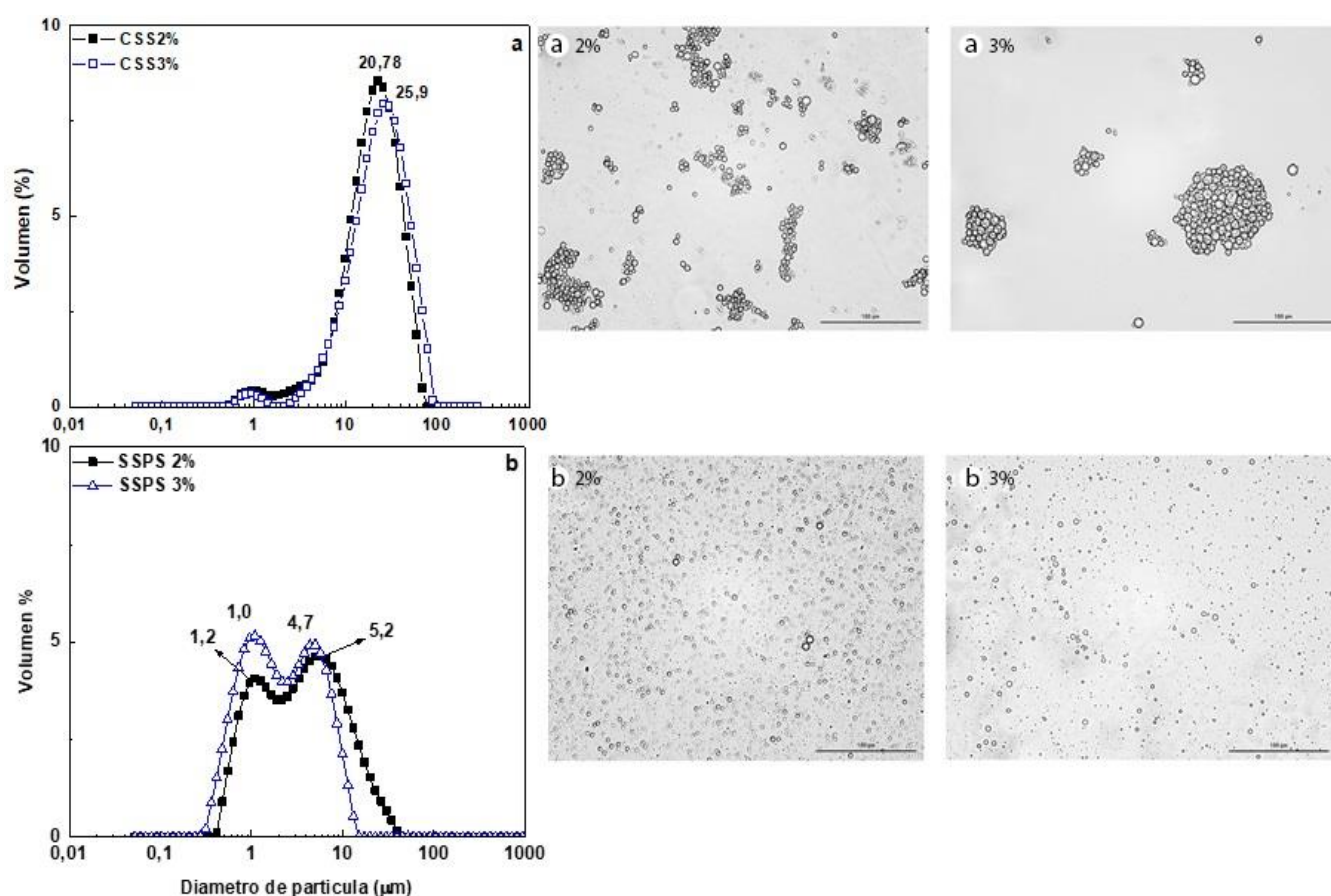


Figura 87: Distribución de tamaño de partícula y microestructura de las emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas al 2,0 y 3,0 % P/P de CSS y SSPS a pH 3,0: a) CSS y b) SSPS. Para el análisis de la microestructura (aumento: 200 $\times$), las emulsiones se diluyeron 1:20 V/V con agua destilada ajustada al mismo pH de las emulsiones. Barra: 100 μm .

Las emulsiones que se elaboraron empleando la estrategia de complejación en fase acuosa (CFA) al 2,0 y 3,0 % P/P, presentaron una DTP de carácter bimodal (Figura 88a), con una población mayoritaria de partículas con diámetros entre 0,1 y 10 μm . En las micrografías ópticas se observó que las emulsiones CFA al 2,0% tienen la presencia de pequeños flóculos, los cuales desaparecieron en las emulsiones formuladas al 3,0 % (Figura 88a), resultado que se condice con valores de GF (Tabla 35). Por lo tanto, en las emulsiones formuladas por la estrategia CFA se evidenció una reducción significativa en los valores $D_{3,2}$, $D_{4,3}$ y GF respecto a las elaboradas con dispersiones acuosas de CSS al 2,0 y 3,0 % ($p < 0,05$; Tabla 35). Ray y Rousseau (2013) estudiaron la formación de complejos entre proteínas aisladas del suero de soja y SSPS logrando emulsiones con tamaños de gotas similares a los obtenidos en este trabajo y con una alta estabilidad frente al almacenamiento estacionario.

Las DTP para las emulsiones elaboradas por medio de la estrategia de complejación en interfase (CIF) presentaron dos poblaciones de partículas, una con diámetros menores a 2,0 μm y otra mayoritaria en el rango 10–210 μm con una moda cercana a 55 μm en ambas concentraciones (Figura 88b). Estos resultados se asocian al mecanismo que se emplea para la formación de las emulsiones, adicionando la dispersión acuosa del SSPS, sobre la emulsión ya formada con CSS a pH isoiónico, antes del ajuste a pH 3,0. Por lo tanto, el mezclado del SSPS en la emulsión ya formada no tiene suficiente energía para que el polisacárido se incorpore a la interfase al ajustar el pH a 3,0 y genere una estabilización estérica entre las gotas. Esto podría atribuirse a que el valor absoluto de los potenciales- ζ de ambos biopolímeros, aunque de signos opuestos, son pequeños (Tabla 33). Además, parte de los biopolímeros del CSS están adsorbidos en la interfase aceite/agua; la repulsión estérica entre los grupos funcionales hidrofílicos del CSS orientados hacia la fase acuosa y los de la cadena ramificada del SSPS impedirían una complejación eficiente. En este caso, el tamaño de las partículas en la emulsión CIF están gobernados por la capacidad del CSS como emulsificante a pH isoiónico, la cual es muy limitada. Por medio de las micrografías ópticas se puede observar que las emulsiones CIF están altamente floculadas y presentan gotas de gran tamaño, que se relaciona con los parámetros mostrados en la Tabla 35.

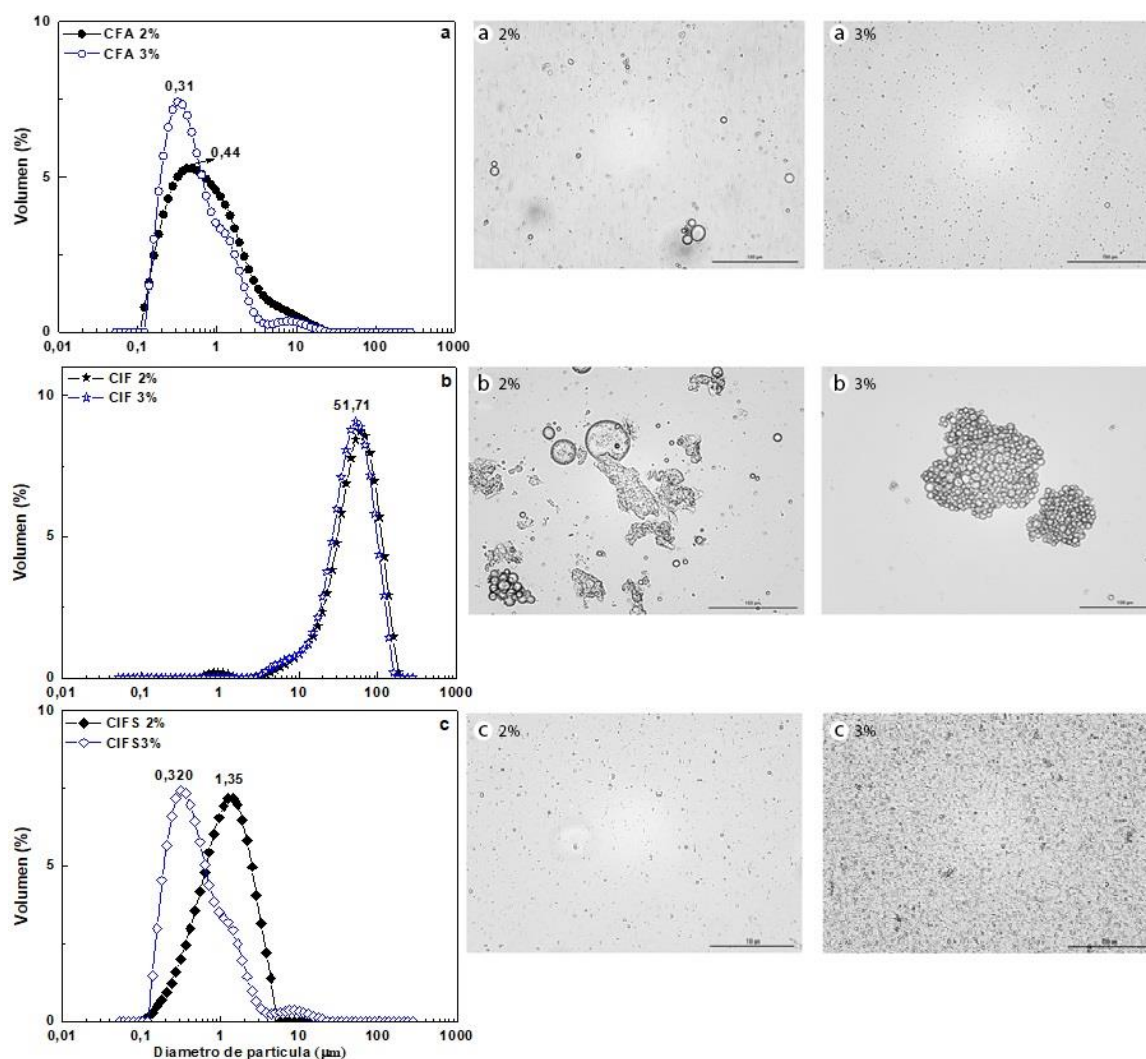


Figura 88: Distribución de tamaño de partícula y microestructura de las emulsiones O/W preparadas con dispersiones mixtas CSS/SSPS (relación máscica 1:1, 2,0 y 3,0 % P/P de cada biopolímero) por medio de las distintas estrategias de complejación a pH 3,0: a) CFA; b) CIF y c) CIFS. Para el análisis de la microestructura (aumento: 200 $\times$), las emulsiones se diluyeron 1:20 V/V con agua destilada ajustada al mismo pH de las emulsiones. Barra: 100 μm .

Tabla 35: Diámetros promedio de De Brouckere ($D_{4,3}$), diámetros promedio de Sauter ($D_{3,2}$) y grado de floculación (GF%) de las emulsiones O/W iniciales elaboradas con dispersiones acuosas (2,0 y 3,0 % P/P) de CSS, SSPS y los sistemas mixtos CSS/SSPS (relación másica 1:1, 2,0 y 3,0 % P/P de cada biopolímero).

Muestra	$D_{4,3}$ (μm)		$D_{3,2}$ (μm)		GF (%)	
	2,0%	3,0%	2,0%	3,0%	2,0%	3,0%
CSS	20,9±0,6 ^{aC}	25,1±0,8 ^{bD}	9,9±0,2 ^{aC}	14,0±0,4 ^{bD}	51,9±0,1 ^{aE}	43,9±0,2 ^{bE}
SSPS	5,3±0,04 ^{bB}	2,9±0,1 ^{aC}	1,9±0,1 ^{bB}	1,3±0,1 ^{aC}	7,6±0,2 ^{bC}	2,5±0,1 ^{aC}
CFA	1,3±0,1 ^{bA}	0,8±0,1 ^{aB}	0,5±0,03 ^{aA}	0,4±0,03 ^{bB}	6,8±0,2 ^{bB}	0,7±0,1 ^{aB}
CIF	41,1±0,9 ^{bD}	37,7±1,2 ^{aE}	23,8±1,4 ^{bD}	20,2±1,1 ^{aE}	30,8±0,4 ^{bD}	10,6±0,3 ^{aD}
CIFS	1,3±0,1 ^{bA}	0,7±0,04 ^{aA}	0,8±0,07 ^{aA}	0,32±0,02 ^{bA}	0,2±0,0 ^{bA}	0,1±0,0 ^{aA}

Los valores se expresaron como el promedio de tres determinaciones independientes ($n = 3$) $\pm$ desvío estándar. Los valores promedio en una misma columna seguidos de letras mayúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher. Los valores promedio en una misma fila seguidos de letras minúscula diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según lo determinado por la prueba de Fisher.

En la Figura 88c se presentan las DTP para las emulsiones elaboradas por la estrategia de complejación en interfase con proceso de sonicación adicional (CIFS). Se observa que las distribuciones tanto al 2,0% como al 3,0% fueron monomodales y con valores $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ inferiores a 2,0 μm en ambas concentraciones (Tabla 35). Estos resultados se pueden asociar a la energía otorgada en el proceso de sonicación después de la complejación, suficiente para que la fracción proteica del SSPS se incorpore en la interfase disminuyendo el tamaño de las gotas y la cadena ramificada del polisacárido se ubica en la capa exterior, formando una emulsión multicapa. Además, es altamente probable que parte del CSS no adsorbido se asocie con el SSPS en la dispersión, formando complejos que también actúan como emulsificantes en la segunda etapa de sonicación. En la formación de sistemas multicapa el biopolímero que se adiciona sobre la emulsión ya formada suele ubicarse en la parte exterior de la interfase y formar una bicapa (Dickinson, 2015). En las micrografías se puede observar que la emulsiones CIFS, a las dos concentraciones de muestra que se elaboraron, no exhiben la presencia de

flóculos y cualitativamente se observan gotas de pequeño tamaño. Este resultado está de acuerdo con los bajos valores observados de $D_{3,2}$, $D_{4,3}$ y GF (Figura 88c; Tabla 35).

En las emulsiones formadas por medio de las estrategias CIFS y CFA se observó que la complejación CSS/SSPS es una buena alternativa para formar emulsiones iniciales con diámetro de gota pequeños y con la capacidad para inhibir la floculación por puenteo durante el proceso de homogeneización; el mismo estaría fundamentalmente asociado al impedimento estérico entre las gotas que ejerce el SSPS.

3.2.4.4.2. Comportamiento de flujo

En la Figura 89 se presenta la viscosidad aparente en función de la velocidad de deformación para las emulsiones elaboradas con dispersiones acuosas de CSS, SSPS y los sistemas mixtos CSS/SSPS elaborados por las diferentes estrategias de complejación (CFA, CIF y CIFS). En líneas generales, se observa que la viscosidad de las emulsiones disminuyó con el incremento de la velocidad de deformación, lo que denota un comportamiento característico para fluidos pseudoplásticos (Figura 89). Estos resultados serían consistentes con la existencia de flóculos (Figuras 87 y 88), los cuales son disgregados a bajas velocidades de deformación.

Con las emulsiones preparadas con las diferentes dispersiones al 2,0%, las curvas de flujo evidenciaron que la viscosidad aparente fue mayor en las emulsiones CSS y CIF; esto se vio reflejado en los valores de K obtenidos por medio del modelo reológico de la ley de Potencia (Tabla 36), que estaría relacionado con la mayor presencia de flóculos observados en estas emulsiones (Figura 87a y 88b). Esta tendencia también se observó a grandes velocidades de deformación. Las emulsiones SSPS y CIFS exhibieron los menores valores de K y al mismo tiempo, valores de n cercanos a 1,0, acorde a un comportamiento de flujo cercano al newtoniano.

Al aumentar la concentración de muestras a 3,0%, se observó una disminución significativa de K en las emulsiones CSS y CFA ($p < 0,05$). Además, el índice de comportamiento de flujo aumentó significativamente en las emulsiones CSS, CFA y CIF ($p < 0,05$). En líneas generales, todas las emulsiones mostraron valores de n cercanos a 1, lo cual estaría asociado a un menor GF de las emulsiones (Tablas 35 y 36).

Las dispersiones acuosas de SSPS, a diferencia de las de otros polisacáridos tienen baja viscosidad debido a su estructura ramificada (Matemu *et al.*, 2009). Al usarlo como emulsificante, se generan emulsiones de bajo GF debido especialmente a la repulsión estérica asociada a las cadenas ramificadas del polisacárido, como se mencionó anteriormente; esto fue consistente con el comportamiento de flujo casi newtoniano de las emulsiones SSPS (Tabla 36). En las emulsiones preparadas con las dispersiones mixtas, la presencia del SSPS reduce el GF debido también a un efecto estérico repulsivo por la presencia de polisacáridos en la interfase, lo cual fue especialmente evidente en las preparadas usando las estrategias CFA y CIFS.

Tabla 36: Constantes reológicas de la ley de potencia (K: índice de consistencia y n: índice de comportamiento de flujo) para las emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas (2,0 y 3,0% P_p de muestra) de concentrado de suero de soja (CSS), de polisacárido soluble de soja (SSPS) y de sistemas mixtos CSS/SSPS (relación másica 1:1; 2,0 y 3,0 % P_p de cada biopolímero) empleando las diferentes estrategias de complejación.

Parámetros	2,0%				
	CSS	SSPS	CFA	CIF	CIFS
K	0,23±0,02 ^{bD}	0,01±0,02 ^{aA}	0,09±0,01 ^{bB}	0,12±0,05 ^{aC}	0,01±0,01 ^{aA}
n	0,59±0,01 ^{aA}	0,95±0,08 ^{aC}	0,79±0,07 ^{aB}	0,59±0,01 ^{aA}	0,99±0,09 ^{aC}
Parámetros	3,0%				
	CSS	SSPS	CFA	CIF	CIFS
K	0,08±0,03 ^{aB}	0,01±0,01 ^{aA}	0,04±0,01 ^{aB}	0,1±0,02 ^{aC}	0,01±0,01 ^{aA}
n	0,89±0,02 ^{bA}	1,01±0,04 ^{aB}	1,0±0,02 ^{bB}	0,90±0,01 ^{bA}	1,0±0,10 ^{aB}

Los valores se expresaron como el promedio de tres mediciones independientes ($n = 3$) $\pm$ desvío estándar. Los valores promedio en una misma columna seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher. Los valores promedio en una misma fila seguidos de letras mayúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según lo determinado por la prueba de Fisher.

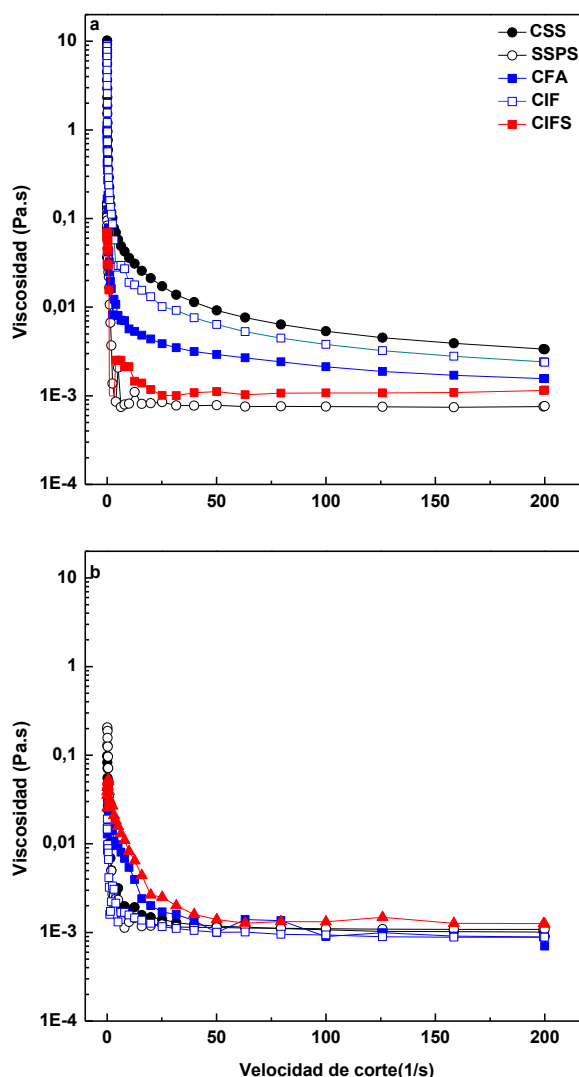


Figura 89: Comportamiento de flujo de las emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas al 2,0 y 3,0% P/P de CSS y SSPS y con sistemas mixtos CSS/SSPS por medio de las diferentes estrategias de complejación (relación másica 1:1; 2,0 y 3,0% P/P de cada biopolímero): a) emulsiones elaboradas al 2,0% y b) emulsiones elaboradas al 3,0%.

3.2.4.4.3. Estudio de estabilidad global de las emulsiones por dispersión múltiple de luz

El analizador vertical de barrido Turbiscan® detecta cambios en el tamaño de partículas de las emulsiones con menor sensibilidad que los registrados por difracción láser o SLS (Palazolo *et al.*, 2005). No obstante, el análisis de los perfiles de *backscattering* (%BS) en función del tiempo permite una evaluación de la desestabilización global sin dilución previa, pudiendo evaluar simultáneamente los procesos de migración de partículas (sedimentación y

cremado) y de variación de tamaño de partículas debido a fenómenos de agregación (floculación y coalescencia) (Cabezas *et al.*, 2012; Palazolo *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2018). Esto no es posible con el analizador SLS, donde la emulsión se somete a agitación y dilución antes de las medidas. Como ensayo complementario, se determinó el %BS en las emulsiones elaboradas con dispersiones acuosas de CSS, SSPS y CSS/SSPS en el transcurso de 7 días de almacenamiento estacionario. En todos los casos, se observó disminución en los valores de %BS debido a un proceso de migración de las gotas desde la parte inferior a la superior del tubo, evidenciándose un corrimiento del perfil de *backscattering* de izquierda a derecha a medida que transcurre el tiempo, el cual produce una disminución del %BS en la parte inferior del tubo de medida (zona 0–20 mm) (Figuras 90 y 91). En general, en condiciones estacionarias de almacenamiento, la coalescencia es un mecanismo de desestabilización más lento que el cremado y la floculación (Britten y Giroux, 1991; McClements, 2016). En base a lo mencionado, los resultados observados indican que las emulsiones inicialmente se desestabilizaron por floculación y cremado (Márquez *et al.*, 2005; Palazolo *et al.*, 2005).

Las emulsiones elaboradas con CSS, independientemente de la concentración, se desestabilizaron al cabo del tercer día de almacenamiento (Figura 90a y b). Estos resultados se correlacionan con los elevados valores de $D_{4,3}$ (superiores a 20 μm) y de GF (Tabla 35) de las emulsiones iniciales, lo cual promueve la migración de flóculos y gotas individuales y la formación de una fase crema a medida que prosigue el tiempo de almacenamiento. En las emulsiones SSPS, las cuales evidenciaron menores valores de $D_{4,3}$ respecto a las de CSS y la ausencia de flóculos (Figura 87, Tabla 35), también se observó separación gravitacional en el tercer día de almacenamiento. No obstante, el corrimiento del perfil fue menos pronunciado, resultado consistente con una mayor estabilidad de las emulsiones SSPS respecto a las de CSS a concentración equivalente de muestra (2,0 y 3,0% P/P) (Figura 90c y d). Estudios previos han demostrado que las emulsiones estabilizadas con SSPS a pH 3,0 exhiben una alta estabilidad a la separación gravitacional durante el almacenamiento estacionario, por la formación de una película interfacial gruesa e hidratada que modifica la densidad de la gota, haciéndola más cercana a la de la fase continua (Ray y Rousseau, 2013).

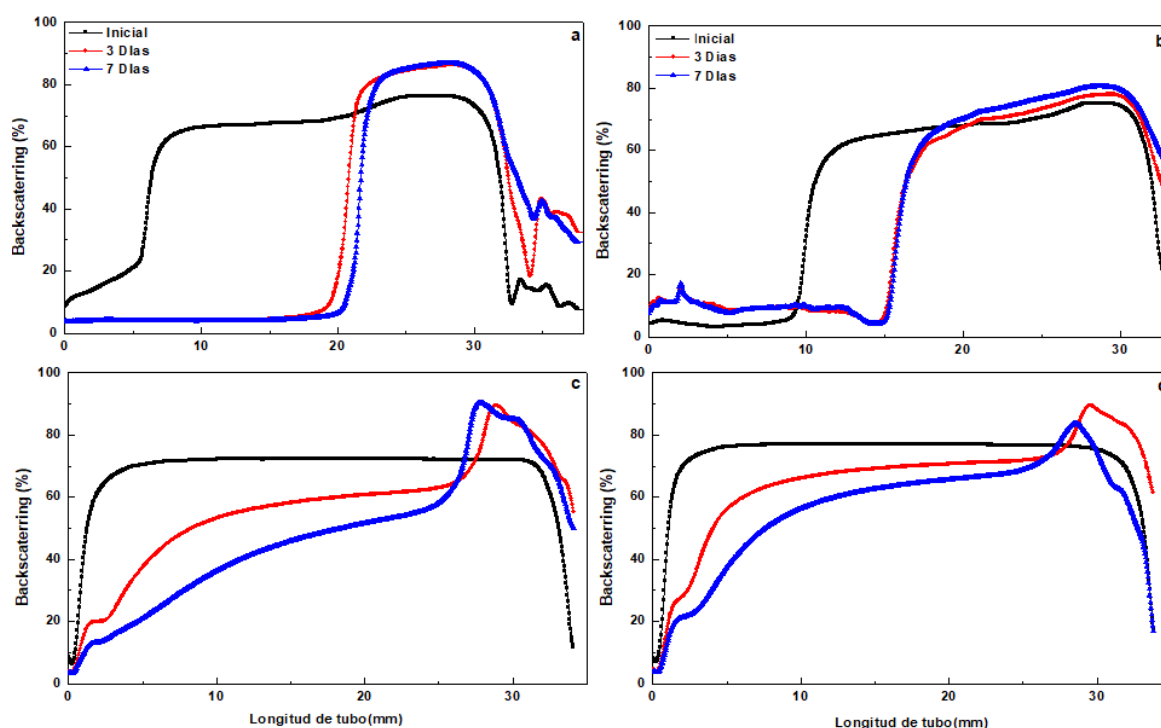


Figura 90: Perfiles de backscattering (%BS) en función de la altura del tubo y el tiempo de almacenamiento de emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas de CSS y de SSPS a pH 3,0: a) CSS 2,0 % P/P ; b) CSS 3,0% P/P ; c) SSPS 2,0 P/P ; d) SSPS 3,0 % P/P .

Las emulsiones preparadas con dispersiones mixtas por medio de las estrategias CFA y CIFS fueron considerablemente más estables que las emulsiones control durante los 7 días de almacenamiento (Figuras 90 y 91). Los perfiles de %BS registraron un menor descenso en la parte inferior del tubo (zona 0–20 mm), acorde con una migración más lenta de gotas a la parte superior. Al incrementar el contenido de muestra al 3,0% en ambas estrategias, se incrementó la estabilidad de las emulsiones exhibiendo una menor variación temporal de los perfiles de backscattering (Figura 91). Estos resultados indican que los complejos proteína-polisacárido con cargas cercanas a la neutralidad, forman emulsiones con tamaño promedio de gota pequeño y bajo grado de floculación, retrasando la separación de las fases en las emulsiones (Ganzevles *et al.*, 2008). En este contexto, los valores de $D_{4,3}$, $D_{3,2}$ y de GF de las emulsiones CFA y CIFS fueron inferiores a los de las emulsiones control (Tabla 35). Resultados similares fueron reportados por Ray y Rousseau (2013), logrando emulsiones estables con sistemas mixtos de proteínas de suero de soja y SSPS ajustadas a pH 3,0.

Por otra parte, las emulsiones CSS/SSPS elaboradas por medio de la estrategia CIF, registraron un notorio descenso del %BS en la zona 0–20 mm, resultado que denota una rápida desestabilización por cremado (Figura 91e y f). De acuerdo con lo descripto anteriormente, la

mayor desestabilización en las emulsiones CIF al 2,0 y 3,0 % podría deberse al elevado tamaño promedio de partícula y la presencia de flóculos, debido a una débil complejación del CSS y SSPS a nivel interfacial, como fue descripto anteriormente.

El estudio de estabilidad global por dispersión múltiple de luz se completó con los valores de índice de estabilidad de Turbiscan (TSI; Figura 92), el cual es un parámetro muy sensible a los procesos de desestabilización por floculación, cremado y coalescencia; cuanto mayor es el TSI más inestable es el sistema (Wang *et al.*, 2018). Los valores de TSI al cabo de 7 días de almacenamiento exhibieron el orden decreciente CSS>CIF>SSPS>CIFS~CFA ($p<0,05$) en todas las concentraciones que fueron formuladas las emulsiones (2,0 y 3,0 % P/P), exhibiendo una buena correlación con los perfiles de %BS. Además, el incremento en la concentración de muestra en todas las emulsiones redujo levemente los valores de TSI (Figura 92b). Por lo tanto, las emulsiones elaboradas por medio de las estrategias CFA y CIFS, fueron las más estables en condiciones de almacenamiento estacionario (Figura 91).

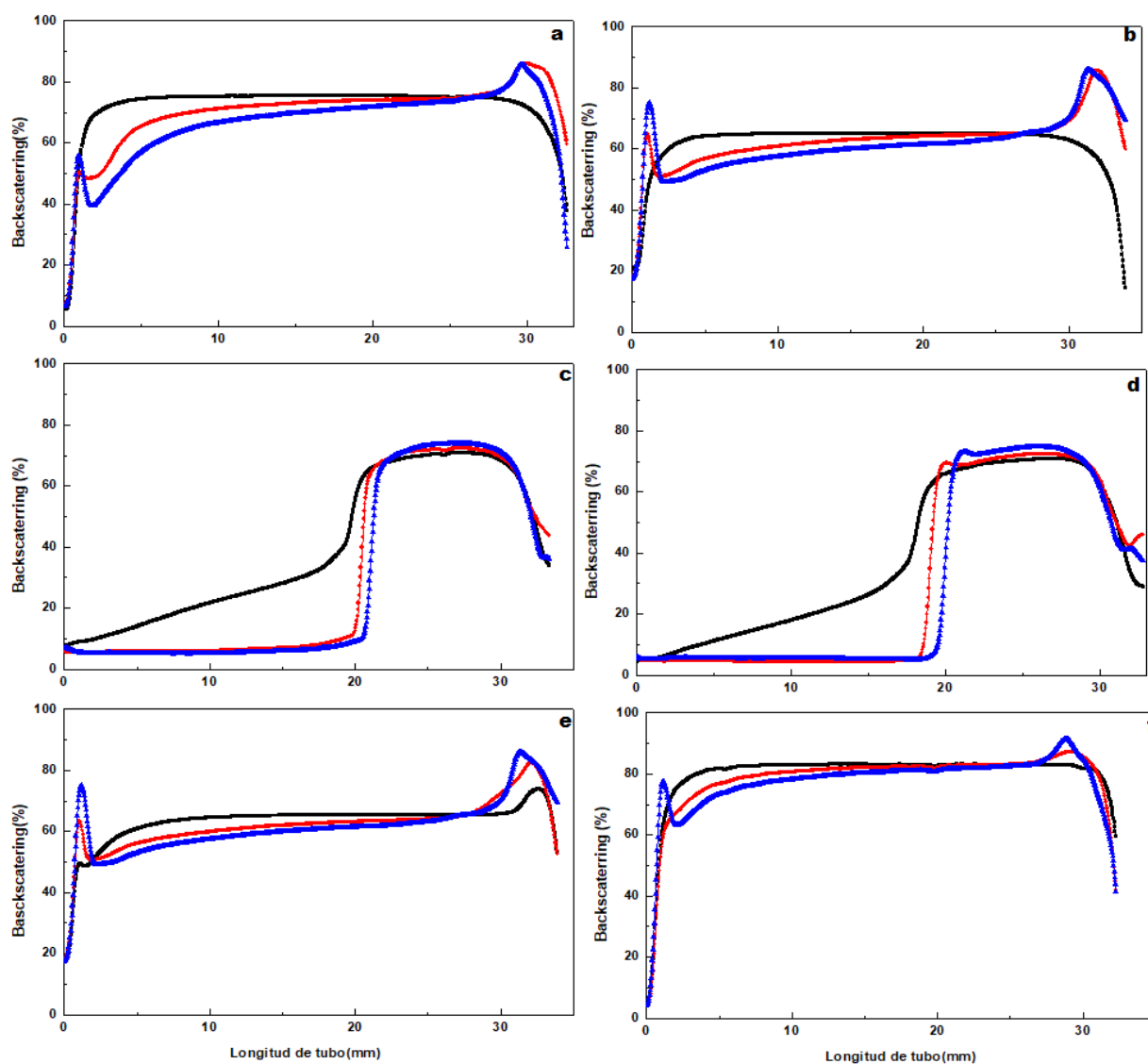


Figura 91: Perfiles de backscattering (%BS) en función de la altura del tubo y el tiempo de almacenamiento de emulsiones (O/W) preparadas con dispersiones mixtas CSS/SSPS (relación másica 1:1; 2,0 y 3,0% P/P de cada biopolímero) a pH 3,0 usando distintas estrategias de complejación: a) CFA 2,0 % P/P, b) CFA 3,0% P/P c) CIF 2,0 P/P; d) CIF 3,0% P/P, e) CIFS 2,0 P/P y f) CIFS 3,0% P/P.

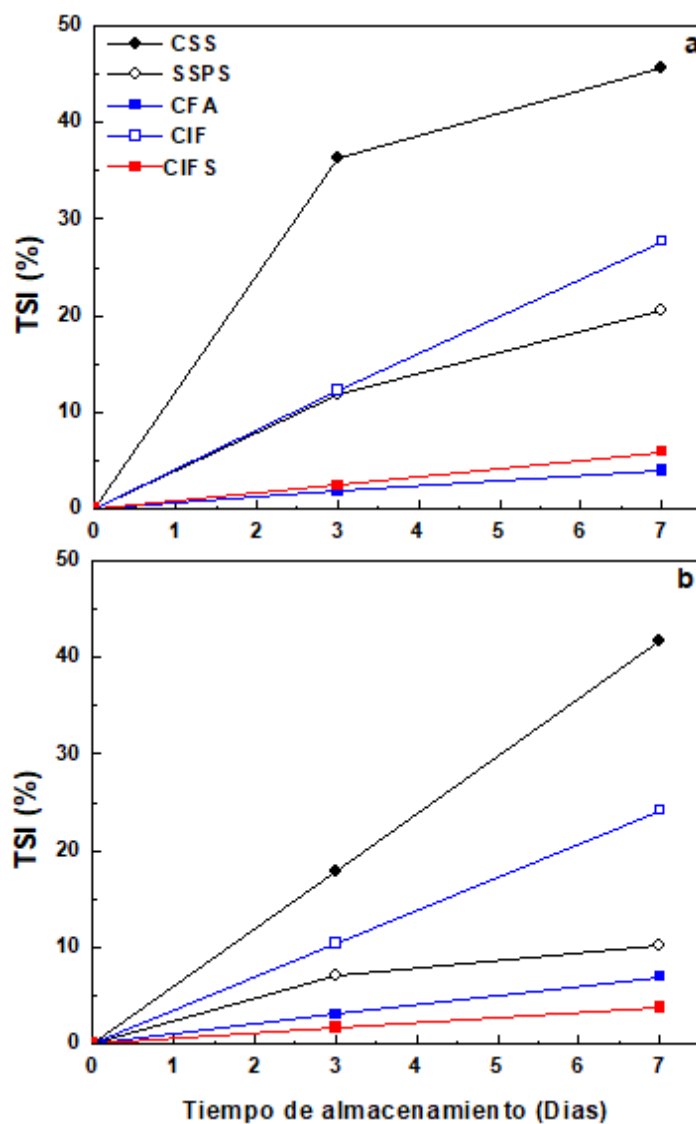


Figura 92: Índice de estabilidad de Turbiscan (TSI) de las emulsiones O/W preparadas con CSS, SSPS y los sistemas mixtos CSS/SSPS (relación másica 1:1) almacenadas estacionariamente durante 7 días: a) Emulsiones elaboradas al 2,0 % de muestra P/P y b) Emulsiones elaboradas al 3,0% de muestra P/P .

3.2.4.5. Evaluación de la estabilidad de las emulsiones frente a los tratamientos tecnológicos

3.2.4.5.1. Congelación-descongelación

En la Figura 93 se presentan los valores de $D_{4,3}$ para las emulsiones en función del tiempo de almacenamiento en congelación. En las emulsiones preparadas con CSS a ambas concentraciones hubo un incremento significativo de los valores $D_{4,3}$ con un incremento superior al 420% luego de 7 días de almacenamiento congelado, observándose al mismo tiempo aceite liberado (*oiling off*) al final del ensayo. Estos (Figura 87; Tabla 35) que son forzados a confinarse en un volumen pequeño de la fase acuosa no congelada, promoviendo la desestabilización por coalescencia.

Las emulsiones SSPS mostraron un mejor comportamiento que las preparadas con CSS en todo el período de tiempo de almacenamiento congelado; durante los dos primeros días de almacenamiento en congelación mostraron un muy bajo incremento de $D_{4,3}$ luego de la descongelación (Figura 93). Estos resultados se asociarían con un menor $D_{4,3}$ y la ausencia de flóculos de estas emulsiones (Figura 87; Tabla 35). Además, durante el almacenamiento congelado, la repulsión estérica promovida por la presencia de los polisacáridos adsorbidos en la interfase y en la fase acuosa no congelada ejercería un efecto estabilizante en un período corto, pero el mismo sería muy limitado a tiempos mayores de almacenamiento. De hecho, al final del ensayo (7 días) se observó aceite liberado en las emulsiones luego de la descongelación a ambas concentraciones de muestra, como consecuencia de un proceso avanzado de coalescencia durante el almacenamiento congelado.

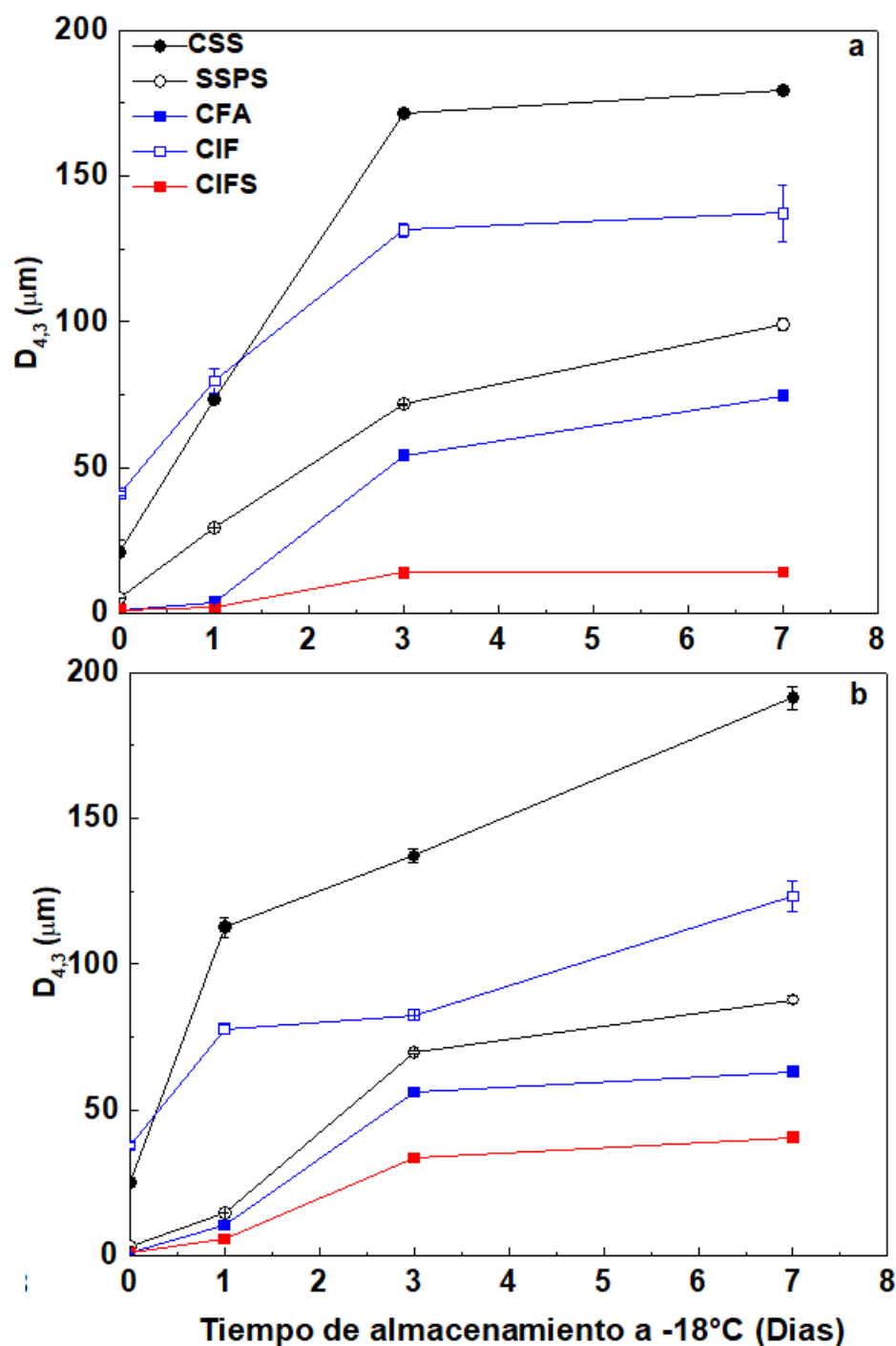


Figura 93: Variación de diámetro promedio de De Brouckere ($D_{4,3}$) con el tiempo de almacenamiento en congelación ($-18,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) de emulsiones O/W ajustadas a pH 3,0 preparadas con CSS, SSPS y los sistemas mixtos CSS/SSPS (relación másica 1:1); a) Emulsiones preparadas al 2,0% P/P y b) Emulsiones preparadas al 3,0% P/P .

Al someter a congelación-descongelación a las emulsiones elaboradas con las distintas estrategias de complejación, se puede observar que las emulsiones CFA y CIFS exhibieron un

menor incremento en los diámetros $D_{4,3}$ durante los siete días de almacenamiento congelado, respecto a las demás emulsiones; no obstante, fue CIFS la que exhibió el menor incremento en el tamaño de partícula (Figura 93). Estos resultados se relacionan con las propiedades de las emulsiones iniciales, ya que ambas emulsiones no mostraron la presencia de flóculos y los valores de $D_{4,3}$ fueron inferiores a $2,0\ \mu\text{m}$ (Tabla 35; Figura 88c). Además, la película interfacial en multicapa formada por medio de esta estrategia sería resistente a los procesos desestabilizantes que tienen lugar durante la congelación y el almacenamiento congelado como la formación de cristales de hielo y el confinamiento de las gotas en un volumen reducido de fase acuosa no congelada. Se sabe que la presencia del SSPS ramificado y cargado negativamente forma una película gruesa y crea una repulsión estérica de corto alcance entre las gotas que impide la desestabilización (Rodríguez-Ruiz *et al.*, 2009). Otros autores han demostrado que los sistemas emulsionados en los que las gotas están recubiertas por biopolímeros empleando la técnica de electrodeposición capa por capa (“*layer by layer*”), mejora las estabilidad a la congelación-descongelación (Aoki *et al.*, 2005). En otro trabajo, las emulsiones multicapa formadas con SDS, quitosano y pectina cítrica preparadas mediante la misma técnica, han logrado buena estabilidad frente a los ciclos de congelación-descongelación, debido a la formación de una película interfacial que estabiliza las gotas por repulsión electrostática y estérica (Thanasukarn *et al.*, 2006).

Las emulsiones elaboradas por la estrategia CFA, no presentaron un incremento significativo en los valores de $D_{4,3}$ durante el primer día del ensayo, sin embargo, a partir del tercer día se observó un aumento en el diámetro promedio lo que indicó el inicio del proceso de desestabilización (Figura 93). No obstante, esta estrategia de complejación permitió obtener emulsiones más estables que las elaboradas con las dispersiones individuales de SSPS y CSS. Nuevamente, al igual que en las emulsiones CIFS, las CFA mostraron bajos valores de $D_{4,3}$ y GF, lo cual podría contribuir al incremento observado en la estabilidad (Tabla 35). Como se observó anteriormente, la viscoelasticidad del de la película interfacial de CSS y del sistema mixto CSS/SSPS fue similar (Figura 86); no obstante, se debe considerar que la adsorción interfacial de las especies durante la preparación de las emulsiones es forzada debido al flujo turbulento y la cavitación, a diferencia de lo que sucede en los ensayos de reología interfacial. Por lo tanto, aunque la presencia del SSPS no incrementa la viscoelasticidad de la película en los ensayos de reología interfacial, en la interfase de las gotas contribuye a la estabilización de las emulsiones frente a la congelación. El SSPS, además del conocido efecto estérico y/o repulsión electrostática que ejerce en la interfase (Nakamura *et al.*, 2004b; Nakamura *et al.*, 2006c; Porfiri *et al.*, 2016), puede interaccionar con el agua por puentes de hidrogeno

hidratando la superficie de las gotas (Komatsu *et al.*, 1997) y así evitando la ruptura de film interfacial durante el almacenamiento congelado. En este contexto, las emulsiones preparadas con complejos WPI/SSPS a pH 3,0 usando una estrategia similar a la CFA fueron más estables a la congelación-descongelación que las emulsiones WPI control (Cabezas *et al.*, 2019). Además, como se ha mencionado previamente, por este mecanismo de complejación, Ray y Rousseau (2013) lograron formar un complejo proteína de suero de soja/polisacárido soluble de soja para estabilizar emulsiones O/W a pH 3,0 contra la coalescencia y separación de fase, logrando excelentes resultados durante 60 días de almacenamiento en condiciones estacionarias. Esta estabilidad fue nuevamente promovida por el efecto estérico entre las gotas.

Como se mencionó anteriormente, las emulsiones CIF exhibieron gotas de gran tamaño y un alto grado de floculación (Figura 88b; Tabla 35), las cuales frente al proceso de congelación-descongelación no arrojaron buenos resultados, registrándose un incremento significativo de $D_{4,3}$ luego de 24 h de almacenamiento congelado y aceite liberado en el séptimo día. Además de la presencia de gotas y flóculos de gran tamaño, la baja interacción entre el SSPS y CSS adsorbido en la interfase contribuiría a la baja estabilidad. Por lo tanto, la etapa de sonicación adicional de la emulsión CIF (estrategia CIFS) fue una estrategia válida para aumentar la estabilidad de las emulsiones frente al almacenamiento estacionario y la congelación-descongelación (Figuras 91–93). Este tratamiento de homogeneización adicional permite entregar la energía suficiente para que el SSPS ingrese a la interfase y produzca además una disminución del tamaño promedio de las gotas individuales y una defloculación. Otros autores también han empleado la sonicación para deflocular emulsiones multicapa, formadas durante el primer proceso de homogeneización y recubiertas por quitosano para formar la multicapa (Ogawa *et al.*, 2003a; Ogawa *et al.*, 2003b).

Como se mencionó anteriormente, se sabe que la congelación-descongelación es un tratamiento altamente desestabilizante para las emulsiones, por fenómenos que ocurren en la fase continua, dispersa y a nivel interfacial (Ghosh *et al.*, 2006; McClements, 2004; 2016; Palazolo *et al.*, 2011, 2013, 2016). Se debe resaltar que las emulsiones se almacenaron a temperatura bajo cero durante un tiempo moderado (7 días) y las mismas se prepararon empleando una fase oleosa con baja temperatura de cristalización. Si bien la temperatura de cristalización del aceite de girasol libre es de aproximadamente $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cercana a la temperatura promedio empleada para el tratamiento de congelación, $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$), al encontrarse dispersado en pequeñas gotas se puede mantener líquido en un período relativamente largo. Por lo tanto, el impacto de la cristalización de la fase dispersa en la desestabilización sería

despreciable, en especial a tiempos cortos de almacenamiento y por ende, los efectos de la congelación mencionados anteriormente podrían atribuirse principalmente a los procesos que ocurren en la fase acuosa y a nivel interfacial (Thanasukarn *et al.*, 2004 Palazolo *et al.*, 2013;).

3.2.4.5.2. Agitación mecánica

En la Figura 94 se observan los valores $D_{4,3}$ de las emulsiones elaboradas con dispersiones acuosas de CSS, SSPS 2,0 y 3,0 % P/P y los sistemas mixtos CSS/SSPS (relación másica 1:1; 2,0 y 3,0% P/P de cada biopolímero), sometidas a tratamiento de agitación mecánica controlada durante 60 min. La emulsión CSS al 2,0 % exhibió un notable incremento de $D_{4,3}$ a los 10 min de agitación y a los 40 min se observó liberación de aceite (*oiling off*) debido a un proceso avanzado de coalescencia, impidiendo la continuación del ensayo. No obstante, al aumentar la concentración de muestra el incremento en los valores $D_{4,3}$ fue menor y se logró completar el ensayo sin liberación del aceite (Figura 94b). La baja estabilidad de las emulsiones elaboradas con CSS frente al esfuerzo de corte, inicialmente se asocia al alto grado de floculación y al elevado tamaño de partícula en las emulsiones iniciales (Tabla 35). Como se mencionó anteriormente en este trabajo el tratamiento de agitación orbital incrementa notablemente la F_C (Britten y Giroux, 1999; McClements, 2016). En esta condición, la E_C entre las gotas de las emulsiones CSS es alta debido a los elevados diámetros iniciales de partícula promoviendo la deformación y ruptura del film interfacial ante un evento de colisión. Las interacciones coloidales entre las gotas serían otro factor fundamental en la estabilidad de las emulsiones frente a tratamientos mecánicos, dado que gobiernan la E_C . Aun cuando las películas interfaciales de CSS mostraron valores de η^* más altos que las de SSPS (2,0%) y similares a los de los sistemas mixtos CSS/SSPS (2,0 y 3,0% P/P) al final de los ensayos de reología interfacial (Figura 86), el mecanismo de adsorción durante la preparación de las emulsiones es forzada, por lo que no puede explicarse la baja estabilidad de las emulsiones CSS sólo en función de este resultado. Dado que a pH 3,0 el potencial- ζ de las dispersiones CSS es levemente positivo (Tabla 33), la intensidad de la repulsión electrostática es baja y hay un predominio de las interacciones coloidales atractivas (interacciones hidrofóbicas y de van der Waals), las cuales contribuirían al incremento de la E_C . En cambio, las emulsiones SSPS fueron mucho más estables que las de CSS a las dos concentraciones ensayadas. En este caso, aunque el potencial- ζ del SSPS a pH 3,0 fue levemente negativo (Tabla 33), la presencia de las

cadenas ramificadas del polisacárido en la interfase y orientadas hacia la fase acuosa otorgarían una repulsión estérica intensa de corto alcance cuando las gotas se acercan ante un evento de colisión. Además, los valores de $D_{4,3}$ y del GF de las emulsiones SSPS fueron significativamente menores que los de las preparadas con CSS (Tabla 35). Estos factores combinados contribuirían a disminuir la E_C , aumentando la estabilidad en condiciones de esfuerzo de corte.

El incremento en los valores $D_{4,3}$ de las emulsiones elaboradas por medio de las estrategias CIFS y CFA fue menor respecto al de los sistemas estabilizados por CSS (Figura 94); no obstante, las emulsiones CIFS exhibieron el menor incremento en los diámetros promedio $D_{4,3}$ durante los 60 minutos de agitación respecto a las demás emulsiones estudiadas, en especial a la concentración más alta ensayada (3,0% P/P) (Figura 94).

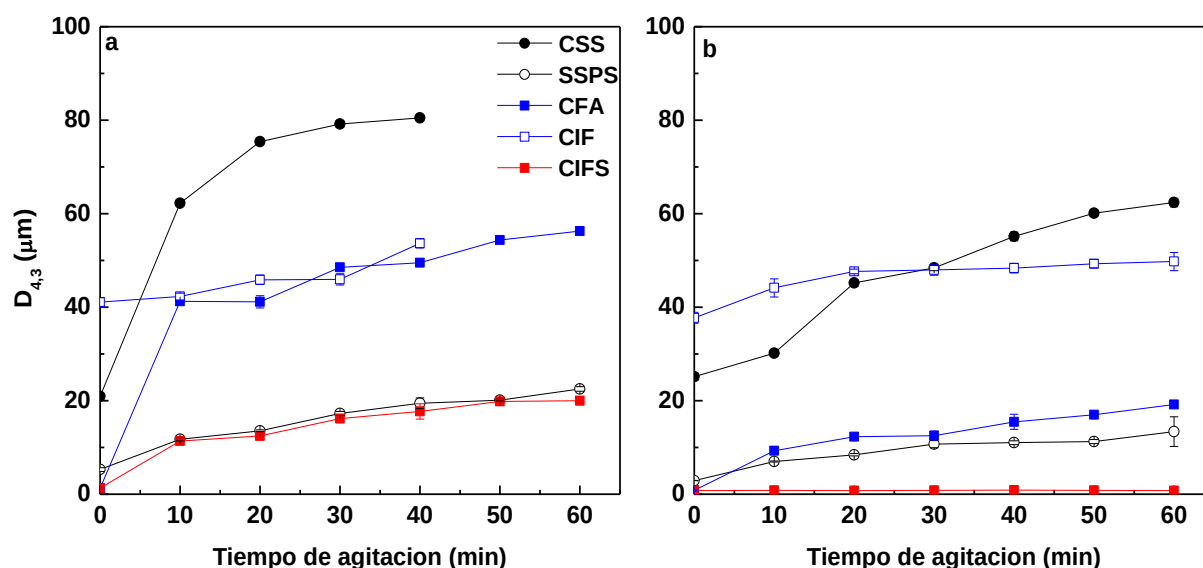


Figura 94: Efecto de la agitación orbital (200 rpm., 25 °C) sobre los diámetros promedio de De Brouckere ($D_{4,3}$) de las emulsiones O/W preparadas con CSS, SSPS y los sistemas mixtos CSS/SSPS (relación másica 1:1) a pH 3,0. **a)** Emulsiones elaboradas al 2,0 % P/P de muestra y **b)** Emulsiones elaboradas al 3,0 % P/P de muestra.

En ambas estrategias (CFA y CIFS), la complejación en fase acuosa e interfacial mejora sustancialmente las propiedades emulsificantes del CSS, disminuyendo significativamente los valores de $D_{3,2}$, $D_{4,3}$ y GF ($p < 0,05$, Tabla 35). Como se mencionó en esta sección, esto contribuye a disminuir la E_C , promoviendo una mayor estabilización frente a la agitación. No

obstante, las propiedades del film interfacial tienen también un rol clave en la estabilidad de las emulsiones. La preparación de una emulsión con proteínas y polisacáridos en condiciones asociativas de interacción permite la creación de un film interfacial mixto con mayor capacidad de resistir el esfuerzo de corte constante. De hecho, cuando el SSPS está débilmente ligado a la interfase, como en las emulsiones CIF, los sistemas son inestables frente a la agitación mecánica.

En todas las emulsiones, al incrementar la concentración de muestra del 2,0 al 3,0% P/P, se mejoró la estabilidad frente a la agitación mecánica. Aunque en algunas emulsiones (CIF, CIFS y SSPS) se observó una leve pero significativa reducción de $D_{4,3}$, $D_{3,2}$ y GF (Tabla 35), los resultados observados podrían atribuirse a una mayor concentración de biopolímeros no adsorbidos, los cuales se ubicarían en la vecindad de las gotas, ejerciendo una repulsión estérica de corto alcance en el momento de la colisión.

A partir de los resultados obtenidos en esta sección se logró evidenciar la interacción entre el CSS y el SSPS. Al preparar las emulsiones por medio de la estrategia CFA la fracción proteica presente en el SSPS permitiría su anclaje a la interfase adsorbiéndose en conjunto con el CSS y la cadena ramificada del polisacárido se orientaría hacia la fase acuosa generando una repulsión estérica entre las gotas. De hecho, la repulsión estérica es un factor importante que contribuye a la estabilización frente a los tratamientos tecnológicos, dado que las emulsiones preparadas con SSPS como único emulsificante fueron más estables que las de CSS. Aunque la diferencia de carga entre ambos biopolímeros a pH 3,0 es relativamente baja (Tabla 33), la asociación electrostática tiene un rol importante, como ha sido propuesto previamente por Ray y Rousseau (2013). Además, en la complejación también intervienen otras interacciones como las hidrofóbicas y los puentes de hidrógeno, que se han evidenciado a partir de una reducción significativa de la turbidez de las dispersiones mixtas CSS/SSPS en presencia de urea 6 M. La estrategia CIFS permitió la incorporación del SSPS a la interfase mediante una etapa adicional de homogenización ultrasónica, permitiendo la formación de una emulsión multicapa, donde las proteínas quedan en la parte interna y la cadena ramificada del polisacárido se orienta hacia la fase acuosa, generando un film interfacial resistente a los tratamientos de estrés tecnológico. Para elucidar las diferencias estructurales del film interfacial en las emulsiones preparadas con ambas estrategias, se requieren estudios más detallados a nivel interfacial, como la evaluación de la microestructura fina.

3.3. Conclusiones parciales

- El concentrado proteico del suero de soja (CSS) presentó una composición química compleja, y está constituido por proteínas, polisacáridos solubles, minerales y otros componentes minoritarios. Las condiciones del tratamiento térmico durante la etapa de concentración promueven una glicosilación incipiente de las proteínas y péptidos y un enriquecimiento en el contenido de proteína del concentrado. A diferencia del concentrado del suero de tofu obtenido a la misma temperatura (CST80), el CSS es pobre en calcio y tiene una composición polipeptídica más simple, en la que predominan la lectina y el factor antitriptico de Kunitz.
- El concentrado de suero de soja exhibió capacidad de formación y estabilización de espumas en el rango de pH de 2,0 a 7,0, con un máximo a pH 4,0, donde la repulsión electrostática es mínima. No obstante, el overrun y la estabilidad fueron significativamente menores que en las espumas preparadas con CST80. Este resultado se podría atribuir al mayor grado de desnaturalización de las proteínas presentes en CST80 que mejora sus propiedades espumantes. Además, la solubilidad proteica de las dispersiones de CST80 fue inferior a la de CSS en todo el rango de pH (2,0–7,0). Por ende, el mayor contenido de partículas insolubles agregadas en la interfase aire/agua presente en el CST80, otorgó mayor viscoelasticidad al film interfacial, contribuyendo a incrementar la estabilidad de las espumas frente al drenado y al colapso.
- Las emulsiones elaboradas con CSS exhibieron, al igual que las de CST80, menor tamaño promedio de partícula, menor grado de floculación y mayor concentración de proteína interfacial a pH 3,0. No obstante, el CST80 exhibió mejores propiedades emulsificantes, asociadas fundamentalmente a la mayor adsorción de partículas insolubles, que minimizan la re-coalescencia y floculación por puenteo durante la homogeneización
- Las emulsiones formuladas con CSS a pH 3,0 fueron más estables frente a los procesos de congelación-descongelación y agitación mecánica. Lo cual está relacionado con el mayor contenido de partículas insolubles en las dispersiones acuosas ajustadas a pH 3,0, formando membranas interfacial con mayor viscoelasticidad, emulsiones con menor GF, mayor concentración de proteína interfacial y porcentaje de proteína adsorbida, siendo

estos factores relevantes para reducir la ruptura de la membrana interfacial durante la formación de hielo y resistir el impacto de las colisiones durante la agitación mecánica.

- Se logró demostrar la formación del complejo entre el CSS y el SSPS mediante la caracterización de las dispersiones acuosas. La complejación se corroboró en los ensayos de turbidez en agua, al observar una reducción en la turbidez en la dispersión de CSS/SSPS, respecto a la de CSS; además, en la dispersión mixta se evidenciaron cambios en la distribución de tamaño de partícula por DLS. Como producto de la asociación proteína-polisacárido, se producen cambios en la carga superficial de las proteínas y, además, la cadena ramificada del polisacárido del SSPS genera una repulsión estérica, desfavoreciendo la auto-asociación de las proteínas del concentrado.
- La capacidad emulsificante del CSS se mejoró mediante la complejación con SSPS en condiciones asociativas de interacción. Las emulsiones preparadas con CSS exhibieron una baja estabilidad a los tratamientos tecnológicos, en tanto que las preparadas usando estrategias que aseguren una fuerte asociación CSS/SSPS en la interfase de las gotas (CFA y CIFS), mostraron una mayor estabilidad. Aunque se requiere un tratamiento adicional de homogeneización ultrasónica, las emulsiones CIFS fueron las más estables a los tratamientos tecnológicos, lo cual se evidenció especialmente a la mayor concentración ensayada (3,0% P/P de cada biopolímero). Para elucidar la organización estructural del film interfacial en las emulsiones CFA y CIFS se requieren estudios más detallados a nivel de la interfase, en especial, la evaluación de la microestructura fina por ensayos de microscopía electrónica.

4.0. CONCLUSIONES FINALES.

4.0. Conclusiones finales

Los concentrados proteicos del suero de tofu presentaron una composición química compleja, la cual se vio modificada por el incremento de la temperatura en la etapa de concentración del suero de tofu (de 50 a 80 °C) y por su neutralización previa a la etapa de concentración. El incremento de temperatura, independientemente del pH inicial del suero (5,6 o 7,0), promovió el enriquecimiento de los concentrados en proteína bruta, cenizas y calcio, la glicosilación incipiente de proteínas y de péptidos, la pérdida de solubilidad de las proteínas y al mismo tiempo, un incremento concomitante en la solubilidad de los polisacáridos. La composición polipeptídica de los todos los concentrados fue similar observando la presencia de subunidades de la β -conglucina, de las proteínas del suero (inhibidor de tripsina de Kunitz, KTI y lectina) y una fracción de bajo peso molecular (BPM). No obstante, los concentrados obtenidos a mayor temperatura (80 °C), mostraron la presencia de agregados proteicos en los que participan enlaces disulfuro. Además, las diferencias estructurales entre los concentrados obtenidos a distintas temperaturas, vinculadas fundamentalmente a un mayor grado de agregación proteica, se evidenciaron por ensayos complementarios de turbidez, FTIR y TGA.

La mayor capacidad espumante para todos los concentrados se evidenció a pH 4,0, lo cual se relaciona con una mayor actividad superficial de los biopolímeros debido al debilitamiento de la repulsión electrostática entre las moléculas de biopolímeros. Además, las espumas formadas a pH 4,0 con el concentrado obtenido a mayor temperatura y con el suero sin neutralizar (80 °C, CST80) fueron las más estables debido a la mayor presencia de partículas de proteínas agregadas que ingresan en la interfase aire/agua y la formación de una película interfacial con mayor viscoelasticidad. Además, el mayor contenido de hidratos de carbono solubles en la fase acuosa, contribuirían por un mecanismo de repulsión estérica, a una disminución del drenaje y colapso de las espumas.

Además, la mejor capacidad emulsificante de todos los concentrados se observó a pH 3,0, resultado no asociado con una mayor actividad superficial en experimentos de interfase planar. A este pH, las emulsiones con CST80 mostraron los menores valores de diámetros promedio de partícula ($D_{4,3}$, $D_{3,2}$) y del grado de floculación (GF). Este resultado estaría vinculado a la presencia de agregados de mayor tamaño que se adsorberían rápidamente en la interfase aceite/agua durante la homogeneización en condiciones de flujo turbulento y cavitación, minimizando la re-coalescencia y la floculación por puenteo. De hecho, a pH 3,0 se observaron los mayores valores de porcentaje de proteína adsorbida (% P_A) y del contenido de

proteína interfacial (Γ), respecto al de las emulsiones a pH 4,0 y 5,0. CST80 mostró a pH 3,0 la mayor capacidad como emulsificante respecto a la de los concentrados obtenidos a menor temperatura; nuevamente este comportamiento se atribuyó a un mayor grado de agregación de los biopolímeros en la dispersiones acuosas, que impacta en los parámetros interfaciales (% P_A , Γ) y en la formación de una película interfacial con mayor viscoelasticidad.

La estabilidad de las emulsiones frente a la congelación-descongelación y a la agitación mecánica fue altamente dependiente de las características de las emulsiones iniciales. Las emulsiones preparadas con todos los concentrados de suero de tofu lograron una estabilidad aceptable frente a la congelación-descongelación luego de 24 horas de almacenamiento congelado, aun cuando este tratamiento se llevó a cabo en ausencia de crioprotectores. No obstante, las emulsiones preparadas con CST80 mostraron la mayor estabilidad asociada con un menor incremento relativo de $D_{4,3}$. Este resultado se atribuiría a distintos factores que operan en forma simultánea: el menor tamaño promedio de partícula y GF, permitiendo que las gotas se acomoden más eficientemente en un volumen reducido de fase acuosa no congelada, la presencia de polisacáridos solubles en la fase acuosa no congelada que ejercerían un efecto estabilizante por un mecanismo estérico y finalmente, los fenómenos a nivel de la interfase, como la presencia de un mayor cantidad de partículas agregadas adsorbidas, que contribuyen a aumentar el % P_A , el Γ y otorgan una mayor viscoelasticidad a la película interfacial. En los ensayos de agitación mecánica, la desestabilización por coalescencia está asociada a un incremento de la eficiencia de colisión. Los factores que incrementaron la estabilidad de las emulsiones a la congelación-descongelación también impactaron favorablemente sobre la estabilidad frente a la agitación mecánica. Las emulsiones preparadas con CST80 ajustadas a pH 3,0 exhibieron la mayor estabilidad durante el tratamiento de agitación mecánica, lo cual se vincula a la presencia de agregados con mayor tamaño en la dispersión acuosa que se adsorben en la interfase aceite/agua y actúan conjuntamente con los factores mencionados, incrementando la estabilidad de las emulsiones, evitando la ruptura de la membrana interfacial durante las colisiones.

La neutralización del suero de tofu con solución de NaOH, por ajuste de pH a 7,0, afectó significativamente la composición química, el grado de agregación de las proteínas, las propiedades espumantes y emulsificantes de los concentrados obtenidos, resultado asociado a una menor retención del calcio en la etapa de diálisis, que impacta en el contenido de calcio y el grado de agregación de los biopolímeros. Los concentrados obtenidos a partir del suero de tofu neutralizado mostraron menor capacidad de formación y estabilización de espumas y al mismo tiempo, menor capacidad emulsificante, respecto a los preparados a partir del suero de tofu sin

neutralización previa. Estos resultados se asocian fundamentalmente con un menor contenido de agregados insolubles que contribuyen al incremento de la viscoelasticidad de las películas interfaciales. En este contexto, la neutralización del suero de tofu como variable del proceso de obtención de los concentrados impacta negativamente en sus propiedades tecnofuncionales, siendo más importante la temperatura en la etapa de concentración.

El concentrado de suero de soja (CSS), está compuesto principalmente por proteínas polisacáridos y sales, siendo pobre en calcio debido a la composición del suero de soja de partida. La composición polipeptídica del CSS, a diferencia de las observadas en los concentrados del suero de tofu, está conformada mayoritariamente por KTI y lectina; al mismo tiempo, la solubilidad proteica fue mayor a la de CST80, resultado consistente con un menor grado de agregación proteica también evidenciado a través de ensayos complementarios (por ejemplo, TGA). El CSS exhibió valores bajos de overrun en todo el rango de pH evaluado y una baja estabilidad de las espumas, en relación con las preparadas con CST80, resultado vinculado con la mayor agregación proteica en CST80 y la formación de membranas interfaciales de mayor viscoelasticidad, debido a la adsorción interfacial de los agregados. Además, el mayor overrun de las espumas de CST80 podría también estar vinculado con el grado de desnaturalización de las proteínas presentes en ambos concentrados, la cual fue total en CST80 y parcial en CSS (85%). Como es sabido, las proteínas desnaturalizadas exponen sus zonas hidrofóbicas y tienen mayor posibilidad de interactuar con la interfase aire/agua.

La capacidad emulsificante del CSS fue mayor a pH 3,0, resultado consistente con los menores valores $D_{3,2}$, $D_{4,3}$ y GF. Este resultado se asoció a una mayor Γ , %P_A y una mayor viscoelasticidad de la película interfacial. Sin embargo, a diferencia de CST80, el CSS exhibió una baja capacidad para formar emulsiones finas y los sistemas fueron muy inestables frente a los procesos de congelación-descongelación y agitación mecánica. Por lo tanto, la preparación de emulsiones con CSS y polisacárido soluble de soja (SSPS) en condiciones asociativas de complejación empleando diferentes estrategias (en fase acuosa, CFA y en interfase con sonicación adicional, CIFS, a pH 3,0), fue una alternativa eficiente no sólo para mejorar la capacidad emulsificante del CSS sino también para incrementar la estabilidad de las emulsiones CSS/SSPS frente al almacenamiento estacionario, la congelación-descongelación y la agitación mecánica. En este caso, fue sumamente importante el empleo de estrategias que aseguren el anclaje del SSPS a la interfase durante la homogeneización, debido a la repulsión estérica generada por las cadenas ramificadas altamente hidrofílicas del polisacárido adsorbido en la interfase. En este contexto, las emulsiones CSS/SSPS con membranas interfaciales mixtas, mostraron al mismo tiempo un bajo tamaño promedio de partícula, bajo GF y alta estabilidad los

tratamientos mencionados, en especial a la mayor concentración ensayada de ambos biopolímeros y con la estrategia CIFS.

La preparación de concentrados del suero de tofu y de soja mediante procedimientos experimentales escalables que permiten el aprovechamiento de las proteínas y polisacáridos, es una interesante alternativa para la valorización de ambos líquidos residuales. Los concentrados del suero de tofu obtenidos a partir de la concentración del suero de tofu en condiciones experimentales adecuadas, exhiben gran potencial para aplicaciones en sistemas dispersos alimentarios de matriz ácida y con una alta estabilidad a los tratamientos de estrés tecnológico, como la congelación-descongelación y agitación mecánica controlada. Además, la complejación del concentrado de suero de soja con SSPS, a través de la formación de películas interfaciales mixtas, constituyen una excelente alternativa para el diseño de emulsiones alimentarias ácidas estables a los tratamientos mencionados.

5.0. REFERENCIAS.

- Adachi, M., Kanamori, J., Masuda, T., Yagasaki, K., Kitamura, K., Mikami, B., & Utsumi, S. (2003). Crystal structure of soybean 11S globulin: Glycinin A3B4 homohexamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12), 7395–7400. <https://doi.org/10.1073/pnas.0832158100>
- Allais I (2010) Emulsification. In: Emulsion Science, Second Edi. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp 143–168
- AOAC (2000). Official Methods of Analysis (18th ed.). Gaithersburg, Maryland: AOAC International.
- AOAC. (1997). Official methods of analysis. (16th Edition, 3rd Revision, Volume II), Gaithersburg, Maryland: AOAC International.
- Aoki, T., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2005). Influence of environmental stresses on stability of O/W emulsions containing droplets stabilized by multilayered membranes produced by a layer-by-layer electrostatic deposition technique. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 209–220. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.05.006>
- Araba, M., & Dale, N. M. (1990). Evaluation of Protein Solubility as an Indicator of Underprocessing of Soybean Meal. *Poultry Science*, 69(10), 1749–1752. <https://doi.org/10.3382/ps.0691749>
- Avilés-Gaxiola, S., Chuck-Hernández, C., & Serna Saldívar, S. O. (2018). Inactivation Methods of Trypsin Inhibitor in Legumes: A Review. *Journal of Food Science*, 83(1), 17–29. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13985>
- Badui Dergal, S. (2015). Química Alimentos. Pearson Educación. México.
- Baldursdottir, S. G., & Jorgensen, L. (2011). The influence of size, structure and hydrophilicity of model surfactants on the adsorption of lysozyme to oil-water interface-Interfacial shear measurements. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 87(1), 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.05.007>
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1767(9), 1073–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2007.06.004>
- Bazinet, L., Ippersiel, D., & Lamarche, F. (1999). Recovery of magnesium and protein from soy tofu whey by electrodialytic configurations. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74(7), 663–668. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199907\)74:7<663::AID-JCTB97>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199907)74:7<663::AID-JCTB97>3.0.CO;2-I)
- Belén, F., Benedetti, S., Sánchez, J., Hernández, E., Auleda, J. M., Prudêncio, E. S., Petrus, J. C. C., & Raventós, M. (2013). Behavior of functional compounds during freeze concentration of tofu whey. *Journal of Food Engineering*, 116(3), 681–688. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.019>
- Belén, F., Sánchez, J., Hernández, E., Auleda, J. M., & Raventós, M. (2012). One option for the management of wastewater from tofu production: Freeze concentration in a falling-film system. *Journal of Food Engineering*, 110(3), 364–373. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.12.036>
- Belitz, H.D., Grosch, W. y Schieberle, P. (2009) Food Chemistry. 4th, revised an extended Edition. Berlin: Springer-Verlag
- Ben Ounis, W., Champagne, C. P., Makhlof, J., & Bazinet, L. (2008). Utilization of tofu whey pre-treated by electromembrane process as a growth medium for *Lactobacillus plantarum* LB17. *Desalination*, 229(1–3), 192–203. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.08.019>
- Benedetti, S., Prudêncio, E. S., Nunes, G. L., Guizoni, K., Fogaça, L. A., & Petrus, J. C. C. (2015). Antioxidant properties of tofu whey concentrate by freeze concentration and nanofiltration processes. *Journal of Food Engineering*, 160, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.03.021>

- Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2002). Protein-polysaccharide interactions for stabilization of food emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 23(1–3), 93–123. <https://doi.org/10.1081/DIS-120003307>
- Boode, K., Walstra, P., & de Groot-Mostert, A. E. A. (1993). Partial coalescence in oil-in-water emulsions 2. Influence of the properties of the fat. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 81(C), 139–151. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(93\)80240-F](https://doi.org/10.1016/0927-7757(93)80240-F)
- Britten, M., & Giroux, H. (1991). Coalescence Index of Protein-Stabilized Emulsions. *Journal of Food Science*, 56(3), 792–795. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb05383.x>
- Buffo, R. A., Reineccius, G. A., & Oehlert, G. W. (2001). Factors affecting the emulsifying and rheological properties of gum acacia in beverage emulsions. *Food Hydrocolloids*, 15(1), 53–66. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(00\)00050-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(00)00050-3)
- Cabezas DM, Ortiz MP, Wagner JR, Porfiri MC (2017) Effect of salt content and type on emulsifying properties of hull soy soluble polysaccharides at acidic pH. *Food Res Int* 97:62–70 . <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.031>
- Cabezas, D. M., Pascual, G. N., Wagner, J. R., & Palazolo, G. G. (2019). Nanoparticles assembled from mixtures of whey protein isolate and soluble soybean polysaccharides. Structure, interfacial behavior and application on emulsions subjected to freeze-thawing. *Food Hydrocolloids*, 95(April), 445–453. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.040>
- Camino, N. A., Sánchez, C. C., Rodríguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2011). Hydroxypropylmethylcellulose at the oil-water interface. Part I. Bulk behaviour and dynamic adsorption as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 25(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.04.012>
- Campbell, I.; Norton, I.; y Morley, W. (1996). Factors controlling the phase inversion of oil-in-water emulsions. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 50 (2), 167-182.
- Carneiro-Da-Cunha, M. G., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2011). Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production. *Carbohydrate Polymers*, 85(3), 522–528. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.001>
- Castellani, O., Belhomme, C., David-Briand, E., Guérin-Dubiard, C., & Anton, M. (2008). The role of metal ions in emulsion characteristics and flocculation behaviour of phosvitin-stabilised emulsions. *Food Hydrocolloids*, 22(7), 1243–1253. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.08.005>
- Černá, M., Barros, A. S., Nunes, A., Rocha, S. M., Delgadillo, I., Čopíková, J., & Coimbra, M. A. (2003). Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives. *Carbohydrate Polymers*, 51(4), 383–389. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00259-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00259-X)
- Cheftel, J.-C., Cuq, J. L. y Lorient, D. Proteínas alimentarias. Ed. Acribia S.A., Vol. 6., 1989, Zaragoza: p. 257-275.
- Chivero, P., Gohtani, S., Ikeda, S., & Nakamura, A. (2014). The structure of soy soluble polysaccharide in aqueous solution. *Food Hydrocolloids*, 35, 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.006>
- Chua, J. Y., & Liu, S. Q. (2019). Soy whey: More than just wastewater from tofu and soy protein isolate industry. *Trends in Food Science and Technology*, 91(November 2018), 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.016>
- Chua, J. Y., Lu, Y., & Liu, S. Q. (2018). Evaluation of five commercial non-Saccharomyces yeasts in fermentation of soy (tofu) whey into an alcoholic beverage. *Food Microbiology*, 76, 533–542.

- <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.07.016>
- Colletti, A. C., Delgado, J. F., Cabezas, D. M., Wagner, J. R., & Porfiri, M. C. (2019). Soybean Hull Insoluble Polysaccharides: Improvements of Its Physicochemical Properties Through High Pressure Homogenization. *Food Biophysics*, 352. <https://doi.org/10.1007/s11483-019-09613-y>
- Damodaran S (2003). Amino acids, peptides, and proteins. En: Food Chemistry. Ed. Fennema, O.R., Marcel Dekker Inc., New York (USA), pp. 321-43
- Damodaran, S. (2006). Protein Stabilization of Emulsions and Foams. *Journal of Food Science*, 70(3), R54–R66. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07150.x>
- de Kruif, C.G., & Tuinier, R. (2001). Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*, 15(4–6), 555–563. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00076-5](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00076-5)
- de Kruif, Cornelus G., Weinbreck, F., & de Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9(5), 340–349. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.09.006>
- Degner, B. M., Chung, C., Schlegel, V., Hutkins, R., & McClements, D. J. (2014). Factors Influencing the Freeze-Thaw Stability of Emulsion-Based Foods. 13, 98–113. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12050>
- Denkov, N., Tcholakova, S., & Politova-Brinkova, N. (2020). Physicochemical control of foam properties. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 703, 135577. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.08.001>
- Dickinson, E. (2020). Advances in food emulsions and foams: reflections on research in the neo-Pickering era. *Current Opinion in Food Science*, 33, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.12.009>
- Dickinson, E. (2015). Colloids in Food: Ingredients, Structure, and Stability. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(1), 211–233. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015651>
- Dickinson, E. Introducción a los coloides alimentarios. Oxford University Press, Oxford (1992)
- Dickinson, E. (1998). Stability and rheological implications of electrostatic milk protein–polysaccharide interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 9(10), 347–354. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00057-0](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00057-0)
- Dickinson, E. (1992). Protein at liquid interfaces. An introduction to food colloids (pp. 140-173). Oxford: Oxford University Press.
- Dickinson, E., & Galazka, V. B. (1991). Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of β -lactoglobulin with polysaccharides. *Topics in Catalysis*, 5(3), 281–296. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80114-8](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80114-8)
- Dickinson, E., & Golding, M. (1997). Rheology of sodium caseinate stabilized oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 191(1), 166–176. <https://doi.org/10.1006/jcis.1997.4939>
- Dickinson, E., & Semenova, M. G. (1992). Emulsifying hybrids properties of covalent. 64, 299–310.
- Dickinson E, McClements D J (1995). Advances in Food Colloids. Ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow (UK)

- Dickinson, E., & Matsumura, Y. (1991). Time-dependent polymerization of β -lactoglobulin through disulphide bonds at the oil-water interface in emulsions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13(1), 26–30. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(91\)90006-G](https://doi.org/10.1016/0141-8130(91)90006-G)
- 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(1), 39–44. <https://doi.org/10.1021/jf00085a010>
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1951). A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*, 168(4265), 167. <https://doi.org/10.1038/168167a0>
- Dust, J. M., Gama, A. M., Flickinger, E. A., Burkhalter, T. M., Merchen, N. R., & Fahey, G. C. (2004). Extrusion Conditions Affect Chemical Composition and in Vitro Digestion of Select Food Ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 2989–2996. <https://doi.org/10.1021/jf049883u>
- Espinosa-Martos, I., & Rupérez, P. (2006). Soybean oligosaccharides. Potential as new ingredients in functional food. *Nutricion Hospitalaria*, 21(1), 92–96.
- Ettelaie, R., Akinshina, A., & Dickinson, E. (2008). Mixed protein-polysaccharide interfacial layers: A self consistent field calculation study. *Faraday Discussions*, 139, 161–178. <https://doi.org/10.1039/b717199d>
- Evans, D. F. & Wennerstrom, H. (1994). En: The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet. Primera edición. VCH Publishers, New York.
- Fei, Y., Liu, L., Liu, D., Chen, L., Tan, B., Fu, L., & Li, L. (2017). Investigation on the safety of Lactobacillus amylolyticus L6 and its fermentation properties of tofu whey. *LWT - Food Science and Technology*, 84, 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.072>
- Fioramonti, S. A., Arzeni, C., Pilosof, A. M. R., Rubiolo, A. C., & Santiago, L. G. (2015). Influence of freezing temperature and maltodextrin concentration on stability of linseed oil-in-water multilayer emulsions. *Journal of Food Engineering*, 156, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.01.01>
- Fischer, P., & Windhab, E. J. (2011). Rheology of food materials. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 16(1), 36–40. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2010.07.003>
- 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(12), 3835–3844. <https://doi.org/10.1021/jp037236k>
- Ford L, Borwankar R, Martin Jr. R W, Holcomb D N (1997). Dressing and sauces. En: Food Emulsions, Third edition, revised and expanded. Ed. Friberg, S.E. y Larsson, K., Marcel Dekker Inc., New York (USA), pp. 361-412
- Fukushima, D. Soy proteins, en Proteins in food processing. Editor Yada, R. Y., CRC Press and Woodhead Publishing limited, 2004, Cambridge.
- Furuta, H., & Maeda, H. (1999). Rheological properties of water-soluble soybean polysaccharides extracted under weak acidic condition. *Food Hydrocolloids*, 13(3), 267–274. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(99\)00009-0](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(99)00009-0)
- Furuta, Hitoshi, Takahashi, T., Tobe, J., Kiwata, R., & Maeda, H. (1998). Extraction of water-soluble soybean polysaccharides under acidic conditions. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62(12), 2300–2305. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.2300>
- Gálvez Mariscal, A., Flores Argüello, I., & Farrés Gonzáles Sarabia, A. (2013). Proteínas. Química de los alimentos. Capítulo 3, Quinta edición. PEARSON,

- Ganzevles, R. A., Fokkink, R., van Vliet, T., Cohen Stuart, M. A., & de Jongh, H. H. J. (2008). Structure of mixed β -lactoglobulin/pectin adsorbed layers at air/water interfaces; a spectroscopy study. *Journal of Colloid and Interface Science*, 317(1), 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.09.030>
- Garti, N. (1997). Double emulsions - Scope, limitations and new achievements. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 123–124, 233–246. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(96\)03809-5](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(96)03809-5)
- Ghosh, S., & Coupland, J. N. (2008). Factors affecting the freeze-thaw stability of emulsions. *Food Hydrocolloids*, 22(1), 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.04.013>
- Ghosh, S., Cramp, G. L., & Coupland, J. N. (2006). Effect of aqueous composition on the freeze-thaw stability of emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 272(1–2), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2005.07.013>
- Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J. M., & Raussens, V. (2006). Evaluation of the information content in infrared spectra for protein secondary structure determination. *Biophysical Journal*, 90(8), 2946–2957. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.072017>
- Gray, J. (2006). Fibra dietética. Definición, análisis, fisiología y salud. International Life Sciences Institute (ILSI) Europe. Bruselas, Bélgica.
- Guerrero, P., Kerry, J. P., & De La Caba, K. (2014). FTIR characterization of protein-polysaccharide interactions in extruded blends. *Carbohydrate Polymers*, 111, 598–605. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.005>
- Gu, Y. S., Decker, E. A., & Julian McClements, D. (2007). Application of multi-component biopolymer layers to improve the freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions: β -Lactoglobulin- κ -carrageenan-gelatin. *Journal of Food Engineering*, 80(4), 1246–1254. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.09.015>
- Guzey, D., & McClements, D. J. (2006). Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in Colloid and Interface Science*, 128–130(2007), 227–248. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.11.021>
- Henao Ossa, J.S, Wagner, J. R., & Palazolo, G. G. (2020). Influence of chemical composition and structural properties on the surface behavior and foam properties of tofu-whey concentrates in acid medium. *Food Research International*, 108772. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108772>
- Hernandez, M. J. M., & Alvarez-Coque, M. C. G. (1992). Available Lysine in Protein, Assay Using o-Phthalaldehyde/ N-Acetyl-L-cysteine Spectrophotometric Method. *Journal of Food Science*, 57(2), 503–505. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05526.x>
- Higashitani, K., Yoshida, K., Tanise, N., & Murata, H. (1993). Dispersion of coagulated colloids by ultrasonication. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 81(C), 167–175. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(93\)80243-8](https://doi.org/10.1016/0927-7757(93)80243-8)
- Hogan, S. A., McNamee, B. F., O’Riordan, E. D., & O’Sullivan, M. (2001). Emulsification and microencapsulation properties of sodium caseinate/carbohydrate blends. *International Dairy Journal*, 11(3), 137–144. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00091-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00091-7)
- Holmberg, K. (2002). Speciality surfactants. In *Handbook of applied surfaces and colloid chemistry Vol. I*. Holmberg, K., Shah, D. O. and Schwuger, M. J., ed. John Wiley & Sons Ltd, England. p. 385-406.
- Huang, Y., Hua, Y., & Qiu, A. (2006). Soybean protein aggregation induced by lipoxygenase catalyzed linoleic

- acid oxidation. *Food Research International*, 39(2), 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.07.012>
- Hunter, W. (2011). Preface. In *Recent Advances and Issues in Environmental Science*. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2014.02.004>
- Ingrassia, R., Palazolo, G. G., Risso, P. H., & Wagner, J. R. (2017). Glycosylation, denaturation, and aggregation of soy proteins in defatted soy flakes flour: Influence of thermal and homogenization treatments. *International Journal of Food Properties*, 20(10), 2358–2372. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1238388>
- Israelachvili, J. N. (2011). Intermolecular and Surface Forces. In *Intermolecular and Surface Forces* (Vol. 46, Issue 6, pp. 191–204). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375182-9.10010-7>
- Iwabuchi, S., & Yamauchi, F. (1987). Determination of Glycinin and P-Conglycinin in Soybean Proteins by.pdf. *200 J. Agric. Food Chem*, 35(1976), 200–205.
- Jafari, S. M., Assadpour, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food Hydrocolloids*, 22(7), 1191–1202. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.09.006>
- Jafari, S. M., Beheshti, P., & Assadpour, E. (2013). Emulsification properties of a novel hydrocolloid (Angum gum) for d-limonene droplets compared with Arabic gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.028>
- Jiménez, A. de L. (2006). Valor nutritivo de la proteína de soya. *Investigación y Ciencia: De La Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 36, 29–34.
- Jose, J., Pouvreau, L., & Martin, A. H. (2016). Mixing whey and soy proteins: Consequences for the gel mechanical response and water holding. *Food Hydrocolloids*, 60, 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.031>
- Kadam, D. M., Thunga, M., Wang, S., Kessler, M. R., Grewell, D., Lamsal, B., & Yu, C. (2013). Preparation and characterization of whey protein isolate films reinforced with porous silica coated titania nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 117(1), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.046>
- Kao, F. J., Su, N. W., & Lee, M. H. (2003). Effect of calcium sulfate concentration in soymilk on the microstructure of firm tofu and the protein constitutions in tofu whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6211–6216. <https://doi.org/10.1021/jf0342021>
- Karr-Lilienthal, L. K., Kadzere, C. T., Grieshop, C. M., & Fahey, G. C. (2005). Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: A review. *Livestock Production Science*, 97(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.01.015>
- Karr-Lilienthal, Lisa K., Grieshop, C. M., Spears, J. K., & Fahey, G. C. (2005). Amino acid, carbohydrate, and fat composition of soybean meals prepared at 55 commercial U.S. soybean processing plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2146–2150. <https://doi.org/10.1021/jf048385i>
- Kasran, M., Cui, S. W., & Goff, H. D. (2013). Emulsifying properties of soy whey protein isolate-fenugreek gum conjugates in oil-in-water emulsion model system. *Food Hydrocolloids*, 30(2), 691–697. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.09.002>
- Kato, A., & Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 624(1), 13–20. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(80\)90220](https://doi.org/10.1016/0005-2795(80)90220)
- Kato, A., Tsutsui, N., Matsudomi, N., Kobayashi, K., & Nakai, S. (1981). Effects of partial denaturation on surface properties of ovalbumin and lysozyme. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(12), 2755–2760. <https://doi.org/10.1080/00021369.1981.10864964>

- Kennedy, A. R. (1993). Anticarcinogenic Activity of Protease Inhibitors Overview. *Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents*, 9–64. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2882-1_2
- Khoder, R. M., Yin, T., Liu, R., Xiong, S., You, J., Hu, Y., & Huang, Q. (2020). Effects of nano fish bone on gelling properties of tofu gel coagulated by citric acid. *Food Chemistry*, 332, 127401. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127401>
- Kim, H. J., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2002). Role of postadsorption conformation changes of β -lactoglobulin on its ability to stabilize oil droplets against flocculation during heating at neutral pH. *Langmuir*, 18(20), 7577–7583. <https://doi.org/10.1021/la020385u>
- Kim, S. H., & Kinsella, J. E. (1985). Surface Activity of Food Proteins: Relationships Between Surface Pressure Development, Viscoelasticity of Interfacial Films and Foam Stability of Bovine Serum Albumin. *Journal of Food Science*, 50(6), 1526–1530. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb10525.x>
- Kinsella, J. E. (1979). Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(3), 242–258. <https://doi.org/10.1007/BF02671468>
- Komatsu, H., Okada, S., & Handa, T. (1997). Suppressive effects of salts on droplet coalescence in a commercially available fat emulsion during freezing for storage. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(4), 497–502. <https://doi.org/10.1021/js960166r>
- Kong, J., & Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8), 549–559. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x>
- Koocheki A, Kadhodaee R (2011) Effect of Alyssum homolocarpum seed gum, Tween 80 and NaCl on droplets characteristics, flow properties and physical stability of ultrasonically prepared corn oil-in-water emulsions. *Food Hydrocoll* 25:1149–1157 . <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.10.012>
- 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(2), 340–343. <https://doi.org/10.1021/jf00104a030>
- Krägel, J., Derkach, S. R., & Miller, R. (2008). Interfacial shear rheology of protein-surfactant layers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 144(1–2), 38–53. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.08.010>
- Kulmyrzaev, A. A., & Schubert, H. (2004). Influence of KC1 on the physicochemical properties of whey protein stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*, 18(1), 13–19. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00037-7](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00037-7)
- Kulmyrzaev A, Sivestre MPC, McClements DJ (2000) Rheology and stability of whey protein stabilized emulsions with high CaCl2 concentrations. *Food Res Int* 33:21–25 . [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00019-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00019-3)
- Kumar, P., Sandeep, K. P., Alavi, S., Truong, V. D., & Gorga, R. E. (2010). Preparation and characterization of bio-nanocomposite films based on soy protein isolate and montmorillonite using melt extrusion. *Journal of Food Engineering*, 100(3), 480–489. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.04.035>
- Kwon, D. Y., Oh, S. W., Lee, J. S., Yang, H. J., Lee, S. H. & Lee, J.H. (2002). Aminomacid substitution of hypocholesterolemic peptide originated from glycinin hydrolyzate. *Food Science and Biotechnology*, 11:55–61.
- Lequeux, F. (1998). Emulsion rheology. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 3(4), 408–411. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(98\)80057-5](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(98)80057-5)
- Li, F., Kong, X., Zhang, C., & Hua, Y. (2011). Effect of heat treatment on the properties of soy protein-stabilised emulsions. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(8), 1554–1560.

- <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02647.x>
- Li, R., Wu, Z., Wang, Y., Ding, L., & Liu, W. (2016). Prevention of irreversible aggregation of whey soy proteins in their foam fractionation from soy whey wastewater. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 11(5), 673–682. <https://doi.org/10.1002/apj.1994>
- Li, R., Wu, Z., Wang, Y., & Liu, W. (2014). Pilot study of recovery of whey soy proteins from soy whey wastewater using batch foam fractionation. *Journal of Food Engineering*, 142, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.05.004>
- Lin, P., & Ng, T. B. (2008). A stable trypsin inhibitor from Chinese dull black soybeans with potentially exploitable activities. *Process Biochemistry*, 43(9), 992–998. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.05.005>
- Liu, C., Wang, X., Ma, H., Zhang, Z., Gao, W., & Xiao, L. (2008). Functional properties of protein isolates from soybeans stored under various conditions. *Food Chemistry*, 111(1), 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.040>
- Liu, K.S. (1999). Soybeans chemistry, technology and utilization. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers.
- Liu, W., Wu, Z. L., Wang, Y. J., Zhao, Y. L., Liu, W. C., & Yu, Y. (2013). Recovery of isoflavones from the soy whey wastewater using two-stage batch foam fractionation. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 52(38), 13761–13767. <https://doi.org/10.1021/ie401442t>
- Li, R., Xintong, J., Youshuang, Z., Yuran, Z., & Jing, G. (2018). Precipitation of proteins from soybean whey wastewater by successive foaming and defoaming. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 128(January), 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2018.04.012>
- Liyang, Z., Li, D., Qiao, S., Johnson, E. W., Li, B., Thacker, P. A., & Han, I. K. (2003). Effects of stachyose on performance, diarrhoea incidence and intestinal bacteria in weanling pigs. *Archives of Animal Nutrition*, 57(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/0003942031000086662>
- Lomakina, K., & Míková, K. (2006). A study of the factors affecting the foaming properties of egg white - A review. *Czech Journal of Food Sciences*, 24(3), 110–118. <https://doi.org/10.17221/3305-cjfs>
- Lucassen-Reynders E H (1993). Interfacial viscoelasticity in emulsions and foams. *Food Struct* 12:1-12
- Mackie, A. R., Gunning, A. P., Ridout, M. J., Wilde, P. J., & Rodriguez Patino, J. (2001). In Situ Measurement of the Displacement of Protein Films from the Air/Water Interface by Surfactant. *Biomacromolecules*, 2(3), 1001–1006. <https://doi.org/10.1021/bm015540i>
- Maeda, H., & Nakamura, A. (2009). Soluble soybean polysaccharide. In *Handbook of Hydrocolloids: Second Edition*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9781845695873.693>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00047-X](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00047-X)
- Malvern Instruments Ltd. (2013). Zetasizer nano user manual. In. Worcestershire, Reino Unido.Prime,
- Martinez, M,J (2010). Impacto de la interacción entre β -lactoglobulina,caseinoglicomacropéptido y polisacáridos en coloides alimentarios. Tesis Doctoral.Facultad de ciencias exactas y naturales,Universidad de Buenos Aires.
- Martínez, K. D., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2009). Interfacial and foaming properties of soy protein and their hydrolysates. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2149–2157.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.03.015>

- Márquez A (2009). Obtención y caracterización de cremas formuladas a base de leche de soja y fortificadas con calcio. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Quilmes (UNQ)
- Márquez, A. L., Wagner, J. R., & Palazolo, G. G. (2018). Effects of calcium content and homogenization method on the microstructure, rheology, and stability of emulsions prepared with soybean flour dispersions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120, 1700500. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700500>
- Márquez, A. L., Palazolo, G. G., & Wagner, J. R. (2005). Emulsiones tipo crema preparadas a base de leche de soja 1: Estudios de estabilidad y determinación de las formulaciones. *Grasas y Aceites*, 56(1), 59–66. <https://doi.org/10.3989/gya.2005.v56.i1.135>
- 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(1), 474–481. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.005>
- Martin, Bos, T. V. V. (2001). Future directions of one-stage and chromogenic assays for blood coagulation factors. *Advances in Colloid and Interface Science*, 46(2), 105–112. <https://doi.org/10.1016 / s0001-8686>
- McClements, D. J. (2004). Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 9(5), 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.09.003>
- McClements, D. J. (2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 24(6), 621–625. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.07.003>
- McClements, D. J. (2012). Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 17(5), 235–245. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2012.06.002>
- McClements, D. J. (2016). *Food Emulsions principles, practices, and techniques* (3rd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b18868>
- Meng, S., Chang, S., Gillen, A. M., & Zhang, Y. (2016). Protein and quality analyses of accessions from the USDA soybean germplasm collection for tofu production. *Food Chemistry*, 213, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.046>
- Mengual, O., Meunier, G., Cayré, I., Puech, K., & Snabre, P. (1999). TURBISCAN MA 2000: Multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*, 50(2), 445–456. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(99\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00129-0)
- Miroljub, Stanojevic, S., Jovanovic, S., & Pesic, M. (2004). Soy protein modification: A review. *Acta Periodica Technologica*, 280(35), 3–16. <https://doi.org/10.2298/apt0435003b>
- Mitidieri, F. E., & Wagner, J. R. (2002). Coalescence of o/w emulsions stabilized by whey and isolate soybean proteins. Influence of thermal denaturation, salt addition and competitive interfacial adsorption. *Food Research International*, 35(6), 547–557. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00155-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00155-7)
- Mojica, L., & Dia; Vermont P, Dia;Gonzales, E. (2014). Soy Proteins. *Applied Food Protein Chemistry*, 9781119944, 139–191. <https://doi.org/10.1002/9781118860588.ch9>
- Mojica, L., Dia, V. P., & De Mejía, E. G. (2014). Soy Proteins. In *Applied Food Protein Chemistry*.

- <https://doi.org/10.1002/9781118860588.ch9>
- Morales, R., Martinez, M. J., & Pilosof, A. M. R. (2017). Synergistic effect of casein glycomacropeptide on sodium caseinate foaming properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 159, 501–508. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.08.017>
- Morin, L. G. (1974). Direct colorimetric determination of serum calcium with o cresolphthalein complexon. *American Journal of Clinical Pathology*, 61(1), 114–117. <https://doi.org/10.1093/ajcp/61.1.114>
- Muller HG (1973). Introducción a la Reología de los Alimentos. Editorial Acirbia. Zaragoza, España
- Murray, B. S. (2002). Interfacial rheology of food emulsifiers and proteins. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 7(5–6), 426–431. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(02\)00077-8](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(02)00077-8)
- Murray, B. S., Durga, K., Yusoff, A., & Stoyanov, S. D. (2011). Stabilization of foams and emulsions by mixtures of surface active food-grade particles and proteins. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 627–638. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.07.025>
- Mussatto, S. I., & Mancilha, I. M. (2007). Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, 68(3), 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.12.011>
- Nakamura, A., Furuta, H., Maeda, H., Nagamatsu, Y., & Yoshimoto, A. (2001). Analysis of structural components and molecular construction of soybean soluble polysaccharides by stepwise enzymatic degradation. In *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* (Vol. 65, Issue 10, pp. 2249–2258). <https://doi.org/10.1271/bbb.65.2249>
- Nakamura, A., Furuta, H., Kato, M., Maeda, H., & Nagamatsu, Y. (2003). Effect of soybean soluble polysaccharides on the stability of milk protein under acidic conditions. *Food Hydrocolloids*, 17(3), 333–343. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(02\)00095-4](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(02)00095-4)
- Nakamura, A., Takahashi, T., Yoshida, R., Maeda, H., & Corredig, M. (2004a). Emulsifying properties of soybean soluble polysaccharide. *Food Hydrocolloids*, 18(5), 795–803. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2003.12.005>
- Nakamura A, Maeda H, Corredig M (2004) Competitive adsorption of soy soluble polysaccharides in oil-in-water emulsions. *Food Res Int* 37:823–831 . <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.04.005>
- Nakamura, A., Maeda, H., & Corredig, M. (2006a). Emulsifying properties of enzyme-digested soybean soluble polysaccharide. *Food Hydrocolloids*, 20(7), 1029–1038. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.12.002>
- Nakamura, A., Yoshida, R., Maeda, H., & Corredig, M. (2006b). The stabilizing behaviour of soybean soluble polysaccharide and pectin in acidified milk beverages. *International Dairy Journal*, 16(4), 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.01.014>
- Nakamura, A., Yoshida, R., Maeda, H., & Corredig, M. (2006c). Soy soluble polysaccharide stabilization at oil-water interfaces. *Food Hydrocolloids*, 20(2-3 SPEC. ISS.), 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.02.018>
- Nakamura, A., Yoshida, R., Maeda, H., Furuta, H., & Corredig, M. (2004b). Study of the role of the carbohydrate and protein moieties of soy soluble polysaccharides in their emulsifying properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(17), 5506–5512. <https://doi.org/10.1021/jf049728f>
- Nishinari, K., Fang, Y., Guo, S., & Phillips, G. O. (2014). Soy proteins: A review on composition, aggregation

- and emulsification. *Food Hydrocolloids*, 39, 301–318. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.013>
- Nkonge, C., & Ballance, G. M. (1982). A Sensitive Colorimetric Procedure for Nitrogen Determination in Micro-Kjeldahl Digests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(3), 416–420. <https://doi.org/10.1021/jf00111a002>
- Ogale, A. A., Cunningham, P., Dawson, P. L., & Acton, J. C. (2000). Viscoelastic, thermal, and microstructural characterization of soy protein isolate films. *Journal of Food Science*, 65(4), 672–679. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb16071.x>
- Ogawa, S., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2003a). Influence of environmental conditions on the stability of oil in water emulsions containing droplets stabilized by lecithin-chitosan membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5522–5527. <https://doi.org/10.1021/jf026103d>
- Ogawa, S., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2003b). Production and characterization of O/W emulsions containing cationic droplets stabilized by lecithin - Chitosan membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2806–2812. <https://doi.org/10.1021/jf020590f>
- Oliver, C. M., Melton, L. D., & Stanley, R. A. (2006). Creating proteins with novel functionality via the maillard reaction: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(4), 337–350. <https://doi.org/10.1080/10408690590957250>
- Ozturk, B., & McClements, D. J. (2016). Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. *Current Opinion in Food Science*, 7, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.07.008>
- Pal, R. (2011). Rheology of simple and multiple emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 16(1), 41–60. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2010.10.001>
- Palazolo, G.G (2006). Formación y estabilidad de emulsiones O/W preparadas con proteínas nativas y desnaturalizadas de soja. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP)
- 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(2), 773–781. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.010>
- Palazolo GG, Sobral PA, Wagner JR (2011) Freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions prepared with native and thermally-denatured soybean isolates. *Food Hydrocoll* 25:398–409 . <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.07.008>
- Palazolo, G. G., Sobral, P. A., & Wagner, J. R. (2016). Impact of Sample Aging on Freeze-Thaw Stability of Oil-in-Water Emulsions Prepared with Soy Protein Isolates. *International Journal of Food Properties*, 19(10), 2322–2337. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1126724>
- Palazolo, G. G., Sorgentini, D. A., & Wagner, J. R. (2004). Emulsifying properties and surface behavior of native and denatured whey soy proteins in comparison with other proteins. Creaming stability of oil-in-water emulsions. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(7), 625–632. <https://doi.org/10.1007/s11746-004-953-0>
- Palazolo, G. G., Sorgentini, D. A., & Wagner, J. R. (2005). Coalescence and flocculation in o/w emulsions of

- native and denatured whey soy proteins in comparison with soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 19(3), 595–604. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.10.022>
- Pan, L. G., Tomás, M. C., & Añón, M. C. (2002). Effect of sunflower lecithins on the stability of water-in-oil and oil-in-water emulsions. *Journal of Surfactants and Detergents*, 5(2), 135–143. <https://doi.org/10.1007/s11743-002-0213-1>
- Peng, X., Ren, C., & Guo, S. (2016). Particle formation and gelation of soymilk: Effect of heat. *Trends in Food Science and Technology*, 54, 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.06.005>
- Perkins, E. G. (1995). Composition of Soybeans and Soybean Products. In *Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization: Vol. I*. AOCS Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-935315-63-9.50006-1>
- Pezennec, S., Gauthier, F., Alonso, C., Graner, F., Croguennec, T., Brulé, G., & Renault, A. (2000). The protein net electric charge determines the surface rheological properties of ovalbumin adsorbed at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 14(5), 463–472. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(00\)00026-6](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(00)00026-6)
- Phillips, P.M. (1981). Protein Conformation at Liquid Interfaces and Its Role in Stabilizing Emulsions and Foams. *Food Technology*, 35, 50-58.
- Phillips, L. G., Whitehead, D. M., & Kinsella, J. (1994). Functional Properties of Modified Proteins. *Structure–Function Properties of Food Proteins*, 233–249. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-554360-6.50017-6>
- Pilosof, A.M.R. (2000). Propiedades de hidratación. En *Caracterización Funcional y Estructural de Proteínas*. Pilosof, A. M. R y Bartholomai, G. B. (Editores) 1era Edición EUDEBA. ISBN 950-23-1023-3, pp 17-23.
- Porfiri, M. C., Cabezas, D. M., & Wagner, J. R. (2016). Comparative study of emulsifying properties in acidic condition of soluble polysaccharides fractions obtained from soy hull and defatted soy flour. *Journal of Food Science and Technology*, 53(2), 956–967. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2149-9>
- Porfiri, M. C., & Wagner, J. R. (2018). Extraction and characterization of soy hull polysaccharide-protein fractions. Analysis of aggregation and surface rheology. *Food Hydrocolloids*, 79, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.050>
- Puppo MC, Beaumal V, Chapleau N, Speroni F, de Lamballerie M, Añón MC, Anton M (2008) Physicochemical and rheological properties of soybean protein emulsions processed with a combined temperature/high-pressure treatment. *Food Hydrocoll* 22:1079–1089 . <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.05.018>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.07.001>
- Ravera, F., Ferrari, M., Santini, E., & Liggieri, L. (2005). Influence of surface processes on the dilational viscoelasticity of surfactant solutions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 117(1–3), 75–100. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2005.06.002>
- Rawle, A. (2005). Basic principles of particle size analysis. Malvern Instruments Limited, technical paper.
- Ray, M., & Rousseau, D. (2013). Stabilization of oil-in-water emulsions using mixtures of denatured soy whey proteins and soluble soybean polysaccharides. *Food Research International*, 52(1), 298–307. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.008>
- Ren, C., Tang, L., Zhang, M., & Guo, S. (2009). Interactions between whey soybean protein (WSP) and beta-conglycinin (7S) during the formation of protein particles at elevated temperatures. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 936–941. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.06.007>
- Ridner. (2006). *Soja propiedades nutricionales y su impacto en la salud*.

- Rodríguez Patino, J. M., Carrera Sánchez, C., & Rodríguez Niño, M. R. (2008). Implications of interfacial characteristics of food foaming agents in foam formulations. *Advances in Colloid and Interface Science*, 140(2), 95–113. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2007.12.007>
- Rodríguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2011). Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1925–1937. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.023>
- Rodríguez Patino, J.M., Rodríguez Niño, M.R. & Carrera Sánchez, C. (2002). Propiedades funcionales de lípidos y proteínas de interés para la formulación de dispersiones alimentarias. En: Proteínas y Polisacáridos como ingredientes funcionales. Añón, M.C & Pilosof, A.M.R (Eds.), pp. 11-28. La Plata, Argentina: Editorial de la Universidad de La Plata
- Rohn CL (1995). Analytical polymer rheology: structure-processing-propertyrelationships. Hanser Publishers, New York.
- Rubinstein, C. (2004). Soja y Nutrición: Informe sobre el uso y la seguridad de la Soja. In *ILSI Argentina*.
- Salarbashi, D., Bazeli, J., & Tafaghodi, M. (2019). Environment-friendly green composites based on soluble soybean polysaccharide: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.110>
- Sceni, P., & Wagner, J. R. (2007). Study on sodium caseinate foam stability by multiple light scattering. *Food Science and Technology International*, 13(6), 461–468. <https://doi.org/10.1177/1082013207087815>
- Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>
- Schägger, H., & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368–379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
- Sharma S., Mulvaney J., Rizvi S. S. H. (2003). Ingeniería en alimentos: Operaciones Unitarias y Prácticas de laboratorio. Ed. Limusa S.A. México.
- Schramm, G. (1994). A Practical Approach to Rheology and Rheometry. *Rheology*, 291. <http://www.polymer.cn/bbs/File/UserFiles/Upload/200904010309415s.pdf>
- Scilingo, A. A., & Añón, M. C. (1996). Calorimetric Study of Soybean Protein Isolates: Effect of Calcium and Thermal Treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(12), 3751–3756. <https://doi.org/10.1021/jf960035b>
- Schramm, L. L. (2006). Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications. In *Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications*. <https://doi.org/10.1002/3527606750>
- Semenova, M. (2017). Protein–polysaccharide associative interactions in the design of tailor-made colloidal particles. In *Current Opinion in Colloid and Interface Science* (Vol. 28, pp. 15–21). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.12.003>
- Setchell, K. D. R., Brown, N. M., Desai, P., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B. E., Brashear, W. T., Kirschner, A. S., Cassidy, A., & Heubi, J. E. (2001). Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *Journal of Nutrition*, 131(4 SUPPL.), 1362–1375. <https://doi.org/10.1093/jn/131.4.1362s>
- Shepherd, R., Robertson, A., & Ofman, D. (2000). Dairy glycoconjugate emulsifiers: Casein-maltodextrins. *Food Hydrocolloids*, 14(4), 281–286. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(99\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(99)00067-3)
- Singh, B. R. (2000). Basic aspects of the technique and applications of infrared spectroscopy of peptides and proteins. *ACS Symposium Series*, 750, 2–37. <https://doi.org/10.1021/bk-2000-0750.ch001>

- Sistema de Estadísticas de Industrialización de Granos del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación (MAGyP, 2019)..
- Sliwinski, E. L., Lavrijzen, B. W. M., Vollenbroek, J. M., Van Der Stege, H. J., Van Boekel, M. A. J. S., & Wouters, J. T. M. (2003). Effects of spray drying on physicochemical properties of milk protein-stabilised emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31(1–4), 219–229. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(03\)00142-5](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(03)00142-5)
- Sobral, A (2015). Suero de Soja y sus Proteínas Aisladas. Estudio de Propiedades Térmicas, Superficiales y Crioprotección. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP).
- Sobral, P. A. (2009). *Relación entre la Composición y la Actividad Antitriptica de Sueros de Soja y Tofu y Comportamiento Térmico de sus Proteínas Aisladas Relationship between the Composition and Antitryptic Activity of Soy and Tofu Wheys and Thermal Behavior of their Isolate*. 65–74. <https://doi.org/10.1612/inf.tecnol.4115it.08>
- Sobral, P. A., Henao Ossa, J. S., Palazolo, G. G., & Wagner, J. R. (2018). Emulsifying Properties of Dried Soy-Whey, Dried Tofu-Whey, and Their Isolated Proteins. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 68(4), 347–358. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2018-0008>
- Sobral, P. A., Palazolo, G. G., & Wagner, J. R. (2011). Effect of water content on thermal behavior of freeze-dried soy whey and their isolated proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3950–3956. <https://doi.org/10.1021/jf104918m>
- Sobral, P. A., Palazolo, G. G., & Wagner, J. R. (2010). Thermal behavior of soy protein fractions depending on their preparation methods, individual interactions, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10092–10100. <https://doi.org/10.1021/jf101957f>
- Song, F., Tang, D. L., Wang, X. L., & Wang, Y. Z. (2011). Biodegradable soy protein isolate-based materials: A review. *Biomacromolecules*, 12(10), 3369–3380. <https://doi.org/10.1021/bm200904x>
- 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(5), 489–507. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1999.tb00033.x>
- Srinivasan, M., Singh, H., & Munro, P. A. (2003). Influence of retorting (121°C for 15 min), before or after emulsification, on the properties of calcium caseinate oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 80(1), 61–69. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00238-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00238-8)
- Sriniworn, P., Youravong, W., & Wichienchot, S. (2015). Permeate flux enhancement in ultrafiltration of tofu whey using pH-shifting and gas- liquid two-phase flow. *Separation Science and Technology*, 50(15), 150527095459001. <https://doi.org/10.1080/01496395.2015.1034370>
- Staswick, P. E., Hermodson, M. A., & Nielsen, N. C. (1981). Identification of the acidic and basic subunit complexes of glycinin. *Journal of Biological Chemistry*, 256(16), 8752–8755.
- Tadros, T. (2004). Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vols. 108–109). <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.025>
- Taylor, P. (1998). Ostwald ripening in emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 75(2), 107–163. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(98\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00035-9)
- Thanasukarn, P., Pongsawatmanit, R., & McClements, D. J. (2004). Influence of emulsifier type on freeze-thaw stability of hydrogenated palm oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 18(6), 1033–1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.04.010>

- Thanasukarn, P., Pongsawatmanit, R., & McClements, D. J. (2006). Utilization of layer-by-layer interfacial deposition technique to improve freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions. *Food Research International*, 39(6), 721–729. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.01.010>
- Thanh, V. H., & Shibasaki, K. (1976). Heterogeneity of beta-conglycinin. *BBA - Protein Structure*, 439(2), 326–338. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(76\)90068-4](https://doi.org/10.1016/0005-2795(76)90068-4)
- Thiansilakul, Y., Benjakul, S., & Shahidi, F. (2007). Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chemistry*, 103(4), 1385–1394. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.055>
- Thiebaud, M., Dumay, E. M., & Cheftel, J. C. (2002). Pressure-shift freezing of o/w emulsions: Influence of fructose and sodium alginate on undercooling, nucleation, freezing kinetics and ice crystal size distribution. *Food Hydrocolloids*, 16(6), 527–545. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00133-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00133-3)
- Tolstoguzov, (1991). Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, 4(6), 429–468. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80196-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80196-3)
- Tomosatsu, H. (1994). Health effects of Oligosaccharides Food Technology October 1994, 61-65.
- Tran, T., & Rousseau, D. (2013). Stabilization of acidic soy protein-based dispersions and emulsions by soy soluble polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 382–392. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.06.001>
- Turner, R. H. and Liener, I. E. 1975. The effect of the selective removal of hemagglutinins on the nutritive value of soybeans. *J. Agric. Food Chem.* 23, 484
- Van Boekel, M. A. J. S. (2001). Kinetic aspects of the Maillard reaction: A critical review. *Nahrung - Food*, 45(3), 150–159. [https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20010601\)45:3<150::AID-FOOD150>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20010601)45:3<150::AID-FOOD150>3.0.CO;2-9)
- Wagner, J.R (2000). Propiedades superficiales. En Caracterización Funcional y Estructural de Proteínas. Pilosof, A. M. R y Bartholomai, G. B. (Editores) 1era Edición EUDEBA. ISBN 950-23-1023-3, pp 55-58.
- Walstra, P. (1996). Emulsion stability, en Encyclopedia of Emulsion Technology, Vol. 4, Becher, P. (ed.), Marcel Dekker Inc., New York
- Walstra P (1983). Formation of emulsion. En: Encyclopedia of Emulsion Technology: Basic Theory. Ed. Becher, P., Marcel Dekker Inc., New York (USA), pp. 57-127
- Walstra, P. (2003). Physical Chemistry of Foods, Marcel Dekker, New York.
- Walstra, P. (1989). *Principles of Foam Formation and Stability* (pp. 1–15). https://doi.org/10.1007/978-1-4471-3807-5_1
- Walstra, P. (2000). Sistemas dispersos: Consideraciones básicas. In O. Fennema (Ed.), Química de los alimentos, Zaragoza: Editorial Acribia, pp173-174.
- Wang, K., Li, G., & Zhang, B. (2018). Opposite results of emulsion stability evaluated by the TSI and the phase separation proportion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 558(August), 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.08.084>
- Wang, L., Wu, Z., Zhao, B., Liu, W., & Gao, Y. (2013). Enhancing the adsorption of the proteins in the soy whey wastewater using foam separation column fitted with internal baffles. *Journal of Food Engineering*, 119(2), 377–384. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.004>

- Werner, K., Pommer, L., Broström, M., Kadam, D. M., Thunga, M., Wang, S., Kessler, M. R., Grewell, D., Lamsal, B., & Yu, C. (2013). Thermal decomposition of hemicelluloses. *Journal of Food Engineering*, 117(1), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2014.08.013>
- Wu, N. N., Huang, X., Yang, X. Q., Guo, J., Zheng, E. L., Yin, S. W., Zhu, J. H., Qi, J. R., He, X. T., & Zhang, J. B. (2012). Stabilization of soybean oil body emulsions using ι-carrageenan: Effects of salt, thermal treatment and freeze-thaw cycling. *Food Hydrocolloids*, 28(1), 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.12.005>
- Xiao, C. W. (2011). Functional soy products. In *Functional Foods: Concept to Product: Second Edition*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857092557.3.534>
- Xiong, Y. L. (1997). Protein Denaturation and Functionality Losses. *Quality in Frozen Foods*, 111–140. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5975-7_8
- Xu, Y. T., & Liu, L. L. (2016). Structural and Functional Properties of Soy Protein Isolates Modified by Soy Soluble Polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(38), 7275–7284. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02737>
- Yin, B., Deng, W., Xu, K., Huang, L., & Yao, P. (2012). Stable nano-sized emulsions produced from soy protein and soy polysaccharide complexes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 380(1), 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.04.075>
- Young, V.; Scrimshaw, N. (1979). Soybean Protein in Human Nutrition. *Advances in Protein Chemistry*, 1(C), 187–208. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60258-2](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60258-2)
- Yu, M. A., & Damodaran, S. (1991). Kinetics of Protein Foam Destabilization: Evaluation of a Method Using Bovine Serum Albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(9), 1555–1562. <https://doi.org/10.1021/jf00009a004>
- Yvon, M., Chabanet, C., & Pélissier, J. -P. (1989). Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions Hypothesis on the precipitation mechanism. *International Journal of Peptide and Protein Research* 34(3), 166–176. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1989.tb00227.x>
- Zangi, R., Zhou, R., & Berne, B. J. (2009). Urea ' s Action on Hydrophobic Interactions Urea ' s Action on Hydrophobic Interactions. *J. Am. Chem. Soc*, 131(January), 1535–1541. <https://doi.org/10.1021/ja807887g>
- Zhang, H., Li, L., Dai, F., Zhang, H., Ni, B., Zhou, W., Yang, X., & Wu, Y. (2012). Preparation and characterization of silk fibroin as a biomaterial with potential for drug delivery. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 117. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-117>
- Zhang, Z., Zhang, Y., Wu, Z., Zhang, Q., & Wang, Y. (2014). Intensification of the interfacial adsorption of whey soy protein in the liquid phase using a foam separation column with the vertical sieve tray internal. *Industrial Crops and Products*, 53, 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.040>
- Zhu, H., & Damodaran, S. (1994). Heat-Induced Conformational Changes in Whey Protein Isolate and Its Relation to Foaming Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(4), 846–855. <https://doi.org/10.1021/jf00040a002>
- Zhu, X. F., Zhang, N., Lin, W. F., & Tang, C. H. (2017a). Freeze-thaw stability of pickering emulsions stabilized by soy and whey protein particles. *Food Hydrocolloids*, 69, 173–184. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.02.001>

Zhu, X., Zheng, J., Liu, F., & Qiu, C. (2017b). *Function characteristics of heat-induced soy protein*.
<https://doi.org/10.1039/c7fo00616k>