



Tesis Doctoral

**PROPIEDADES FUNCIONALES DE AISLADOS
PROTEICOS DE CAJANUS CAJAN. EFECTO DEL
PH Y FUERZA IÓNICA**

Tesista: Bioquímica Eliana Isabel Fernández Sosa

Directora: Dra. María Victoria Avanza

Co-Directora: Dra. Alejandra Viviana Quiroga

Sub-Directora: Dra. María Guadalupe Chaves



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura

AÑO 2022



Dedicado a mis papás, Kelly y Tofi

El presente trabajo de tesis, para optar por el título de Doctor de la Universidad Nacional del Nordeste en Química, tuvo como lugar de trabajo el Laboratorio de Tecnología Química – Dr. Jorge R. Avanza de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de la Universidad Nacional del Nordeste, perteneciente al Instituto de Química Básica y Aplicada del Nordeste Argentino (IQUIBANEA) de doble dependencia UNNE-CONICET. Parte de las determinaciones también se realizaron en:

- Laboratorio de Proteínas del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). UNLP-CONICET-CIC. La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Facultad de Ciencias de la Alimentación-Universidad Nacional de Entre Ríos. Concordia, Entre Ríos, Argentina.
- Laboratorio de Investigación en Funcionalidad y Tecnología de Alimentos (LIFTA), Departamento de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes. Bernal, Buenos Aires, República Argentina.



Agradecimientos

A la Dra. María Guadalupe Chaves, a la Dra. Alejandra Viviana Quiroga y a la Dra. María Victoria Avanza por compartir conmigo todo lo que saben, por guiarme en cada paso, por ser ejemplo de trabajo y dedicación.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por otorgarme la beca con la cual pude realizar mi formación doctoral.

A la Secretaría General de Posgrado de la UNNE por los subsidios otorgados para la realización de cursos de posgrado y viajes a la ciudad de La Plata.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura por la formación académica que recibí tanto en mi carrera de grado como de posgrado.

A mis compañeros de todos los días, Cin, Mela, Feli, Andre, Vic, Bety, Guada, Marga, Belén, Pinty, Adri, Victoria, Gonzalo, Enzo, Karina, Melisa y Sonia. Gracias por las horas de mesada y de SUM compartidas.

Al sucucho móvil, por estar en cada momento de esta tesis, porque en Uds. encontré la escucha y la palabra justa. Gracias infinitas por su cariño y amistad.

A todo el grupo del laboratorio de Proteínas de CIDCA por recibirme siempre de mejor manera, en especial agradezco a Mati, Martín y Mariela por su ayuda con los ensayos.

A Mati por recibir a este ekeko andante, por abrirme las puertas de su casa, por brindarme su amistad.

A Mercedes, Juan y Lucas de FCAL por su colaboración y buena predisposición para poder finalizar parte de la etapa experimental de esta tesis.

Al Dr. Gonzalo Palazolo y su grupo de trabajo por brindarme todo lo necesario para el uso de los equipos en su Universidad.

A mi familia Samaritana por hacerme el aguante en cada ausencia, por todo lo aprendido junto a Uds.

A mi Familia por acompañarme en todo lo que emprendo. A todos los que contribuyeron a esta tesis separando porotos, en especial a la Nona.

A Esteban por ser mi mejor compañero, por alentarme y entender cada momento robado para la escritura de esta tesis.

A mi buen Jesús porque solo Él conoce todos los pormenores del camino recorrido, por cada una de las personas que me regaló, por todos sus detalles.

Los resultados de este trabajo de tesis fueron parcialmente publicados en dos artículos de revistas con referato, en cuatro presentaciones a Congresos y en cuatro Jornadas Científicas:

Fernández Sosa, E.I, Chaves, M.G., Ossa, J.S.H., Quiroga, A.V., & Avanza, M.V. (2021). Protein isolates from *Cajanus cajan* L. as surfactant for o: w emulsions: pH and ionic strength influence on protein structure and emulsion stability. *Food Bioscience*, 42, 101159. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101159>

Fernández Sosa, E.I., Chaves, M. G., Quiroga, A. V., & Avanza, M. V. (2021). Comparative study of structural and physicochemical properties of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) protein isolates and its major protein fractions. *Plant Foods for Human Nutrition*, 76(1), 37-45. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00871-7>

Fernández Sosa, E. I., Peyrano, F., Chaves, M. G., Quiroga, A. V., & Avanza M V. “Caracterización de geles proteicos de guandú”. Modalidad de E-PÓSTER y VIDEO. *Décimo Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos, INNOVA 2021*. Montevideo, Uruguay. 27 de septiembre al 1 de octubre de 2021.

Fernández Sosa, E. I., Thompson, C. M. B, Chaves, M. G., Quiroga, A. V., & Avanza MV. “Influencia del pH en la formación y estabilidad de emulsiones O:W usando proteínas de *Cajanus cajan* como tensioactivos”. Modalidad de RESUMEN y PÓSTER. *XXI Congreso Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Buenos Aires, Argentina. 20, 21 y 22 de noviembre de 2019.

Fernández Sosa, E. I., Chaves, M. G., Quiroga, A. V., & Avanza MV. “Fracciones proteicas de *Cajanus cajan* cultivado en el Nordeste Argentino”. Modalidad ORAL. *VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Córdoba, Argentina. 1; 2 y 3 de octubre de 2018.

Fernández Sosa, E. I., Thompson, C. M. B, Chaves, M. G., Quiroga, A. V., & Avanza MV. “Influencia del pH de extracción de aislados proteicos de guandú en las características estructurales y fisicoquímicas”. Modalidad de RESUMEN y PÓSTER. *VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Córdoba, Argentina. 1; 2 y 3 de octubre de 2018.

Fernández Sosa, E. I., Chaves, M. G., Quiroga, A. V., & Avanza, M. V. “Gelificación de aislados proteicos de *Cajanus cajan*”. Modalidad de RESUMEN y PÓSTER. *XXVI Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste*. Modalidad virtual. 17 y 18 de junio del 2021.

Fernández Sosa, E. I., Chaves, M. G., Quiroga, A. V., & Avanza, M. V. “Efecto del pH en las propiedades emulsificantes de aislado proteico de *Cajanus cajan*”. Modalidad de PÓSTER. *XXVII Jornadas de Jóvenes Pesquisadores de AUGM*. Sao Carlos, Brasil. 23, 24 y 25 de octubre de 2019.

Fernández Sosa, E. I., Chaves, M. G., Quiroga, A. V., & Avanza, M. V. “Efecto del pH en las propiedades emulsificantes de aislado proteico de *Cajanus cajan*”. Modalidad ORAL. *XXV Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste*. Chaco, Argentina. 21 y 22 de junio del 2019.

Fernández Sosa, E. I., Chaves, M. G., Quiroga, A. V., & Avanza, M. V. “Composición polipeptídica de fracciones mayoritarias y aislados proteicos de *Cajanus cajan*”. Modalidad de RESUMEN y PÓSTER. *XXIV Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste*. Corrientes, Argentina. 21 y 22 de junio del 2018.

Premio

Premio al mejor trabajo “Efecto del pH en las propiedades emulsificantes de aislado proteico de *Cajanus cajan*”. Fernández Sosa, E. I., Chaves, M. G., Quiroga, A. V., & Avanza, M. V. Modalidad ORAL. *XXV Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste*. Chaco, Argentina. 21 y 22 de junio del 2019. Trabajo seleccionado para participar de las Jornadas de jóvenes investigadores de AUGM 2019

ÍNDICE

RESUMEN	I
CAPÍTULO I: Introducción	
I.1. El guandú. Historia y situación actual	3
I.2. Características generales y usos	4
I.3. Composición de la semilla	6
I.4. Proteínas	8
I.4.1. Aislados proteicos	9
I.5. Propiedades tecnofuncionales	11
I.5.1. Propiedades superficiales de las proteínas	14
I.5.1.1. Propiedades emulsionantes	15
I.5.1.2. Propiedades espumantes	20
I.5.2. Gelificación	24
I.6. Efecto del pH y fuerza iónica	26
I.7. Hipótesis de trabajo	29
CAPÍTULO II: Objetivos	
II.1. General	33
II.2. Específicos	33
CAPÍTULO III: Materiales y Métodos	
III.1. Material Vegetal	37
III.1.1. Harinas	37
III.1.2. Obtención de fracciones proteicas mayoritarias	37
III.1.3. Obtención de aislados proteicos	38
III.1.4. Rendimiento en peso y de proteínas totales	38
III.2. Composición química	38
III.2.1. Contenido de proteínas bruta	38
III.2.2. Humedad	39
III.2.3. Cenizas	39
III.3. Caracterización físico-química y estructural de fracciones y aislados proteicos	39
III.3.1. Electroforesis	39

III.3.1.1. Electroforesis monodimensional (SDS-PAGE)	39
III.3.1.2. Electroforesis bidimensional (IEF/SDS-PAGE)	40
III.3.2. Estabilidad térmica	41
III.3.3. Cromatografía rápida de proteínas en medio líquido (FPLC)	41
III.3.3.1. Cromatografía de exclusión molecular (CEM)	41
III.3.3.2. Cromatografía de intercambio iónico (CII)	43
III.3.4. Espectroscopia infrarroja	43
III.3.5. Fluorescencia intrínseca	44
III.3.5.1. Desnaturalización con urea	45
III.3.6. Hidrofobicidad superficial	48
III.3.7. Solubilidad	49
III.3.7.1. En distintos solventes	49
III.3.7.2. En función del pH	49
III.3.8. Color	49
III.4. Influencia del pH y la fuerza iónica	50
III.4.1. Soluciones reguladoras del estado ácido-base y de la fuerza iónica (<i>buffers</i>)	50
III.4.2. Propiedades físico-químicas y estructurales de A8	50
III.4.2.1. Electroforesis monodimensional (SDS-PAGE)	50
III.4.2.2. Medida del potencial Zeta	51
III.4.2.3. Fluorescencia intrínseca	51
III.4.2.4. Estabilidad térmica	51
III.4.2.5. Solubilidad	52
III.4.2.6. Tensión interfacial	52
III.4.3. Propiedades tecnofuncionales	54
III.4.3.1. Propiedades emulsionantes	54
III.4.3.1.1. Preparación de emulsiones	54
III.4.3.1.2. Distribución de tamaño de partícula	54
III.4.3.1.3. Viscosidad aparente de emulsiones	57
III.4.3.1.4. Microscopía confocal de barrido	57
III.4.3.1.5. Estabilidad de las emulsiones	58
III.4.3.2. Propiedades espumantes	59
III.4.3.2.1. Preparación de espumas	59
III.4.3.2.2. Estabilidad	62

III.4.3.3. Gelificación	63
III.4.3.3.1. Mínima concentración de gelificación	63
III.4.3.3.2. Reología dinámica de pequeña deformación	64
III.4.3.3.3. Obtención de geles por tratamiento térmico	64
III.4.3.3.4. Capacidad de retención de agua	65
III.4.3.3.5. Color	66
III.4.3.3.5.1. Polifenoles totales	66
III.4.3.3.6. Microscopía electrónica de barrido	66
III.4.3.3.7. Perfil de textura de geles proteicos	67
III.5. Análisis estadístico de los datos	68

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO IV: Fracciones proteicas y aislados proteicos de *Cajanus cajan*

IV.1. Fracciones proteicas mayoritarias. Rendimientos de extracción	73
IV.2. Aislados proteicos. Rendimientos de extracción y composición centesimal	73
IV.3. Caracterización físico-química y estructural de fracciones y aislados proteicos	74
IV.3.1. Electroforesis mono- y bidimensional	74
IV.3.2. Estabilidad térmica	78
IV.3.3. Cromatografía rápida de proteínas en medio líquido (FPLC)	81
IV.3.3.1. Cromatografía de exclusión molecular (CEM)	81
IV.3.3.2. Cromatografía de intercambio iónico (CII)	84
IV.3.4. Espectroscopia infrarroja	87
IV.3.5. Fluorescencia intrínseca	90
IV.3.5.1. Desnaturalización con urea	92
IV.3.6. Hidrofobicidad Superficial	95
IV.3.7. Solubilidad	97
IV.3.7.1. En distintos solventes	97
IV.3.7.2. Solubilidad en función del pH	98
IV.3.8. Color	99
IV.4. Conclusiones parciales	101

CAPÍTULO V: Influencia del pH y la fuerza iónica en las propiedades fisicoquímicas y estructurales de A8

V.1. Análisis de la composición polipeptídica. Electroforesis SDS-PAGE	105
------------------------------------------------------------------------	-----

V.2. Potencial Zeta	106
V.3. Fluorescencia intrínseca	107
V.4. Estabilidad térmica	109
V.5. Solubilidad proteica	112
V.6. Tensión interfacial	113
V.7. Conclusiones parciales	116

CAPÍTULO VI: Propiedades superficiales – Propiedades emulsionantes

VI.1. Distribución de tamaño de partícula	119
VI.2. Viscosidad aparente de las emulsiones	127
VI.3. Microscopía confocal de barrido	129
VI.4. Índice de floculación e índice de coalescencia	132
VI.5. Estabilidad global de las emulsiones	136
VI.6. Conclusiones parciales	142

CAPITULO VII: Propiedades superficiales – Propiedades espumantes

VII.1. Capacidad de formación de espuma	145
VII.2. Estabilidad de la espuma	153
VII.2.1. Modelado de la desestabilización de la espuma	160
VII.3. Conclusiones parciales	166

CAPÍTULO VIII: Propiedades de interacción proteína-proteína - Gelificación

VIII.1. Mínima concentración de gelificación	169
VIII.2. Reología dinámica de pequeña deformación	170
VIII.3. Capacidad de retención de agua	181
VIII.4. Color	183
VIII.5. Microscopía electrónica de barrido	186
VIII.6. Perfil de textura de geles proteicos	188
VIII.7. Conclusiones parciales	191

CONCLUSIONES GENERALES

195

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

201

RESUMEN

Cajanus cajan (CC) es una legumbre perteneciente a la familia Fabaceae y se encuentra ampliamente distribuida en el mundo. Este cultivo se utiliza para la alimentación humana y animal, como cultivo de cobertura y abono verde, como reparo del viento para otros cultivos o estructuras, como cerco vivo para aves de corral y para la obtención de leña de consumo doméstico. Sus semillas son consideradas una fuente de alimento saludable con cantidades suficientes de proteínas (19-23%), hidratos de carbono (35-56%), además de vitaminas y minerales.

La industria alimentaria busca permanentemente proteínas alternativas que puedan competir con las que dominan el mercado para el desarrollo de nuevos productos. En este sentido, las proteínas vegetales constituyen una opción atractiva, dado no solo por sus propiedades tecnofuncionales sino también por su aporte nutritivo al ser incorporado como ingrediente en un alimento. Si bien existen varios métodos de extracción de proteína y todos son útiles de acuerdo con el fin buscado, el método de extracción alcalina y posterior precipitación isoeléctrica es un método sencillo, rápido y de bajo costo para la obtención de aislados proteicos con distintas propiedades físico-químicas y estructurales que determinarán sus propiedades tecnofuncionales, así como su aplicación como ingredientes alimentarios. El objetivo general de esta tesis fue estudiar desde el punto de vista estructural y funcional las proteínas de CC a efectos de obtener conocimientos que puedan conducir a potenciales aplicaciones en la industria alimentaria

A partir de la harina de las semillas de CC, se obtuvieron las fracciones proteicas mayoritarias, ALB y GLB, y aislados proteicos por extracción alcalina (variando el pH de 8,0 a 11,0) y posterior precipitación isoeléctrica. Los aislados proteicos obtenidos se nombraron A8, A9, A10 y A11, de acuerdo con el pH de extracción utilizado. Las fracciones ALB y GLB presentaron diferencias en su composición polipeptídica, siendo los polipéptidos presentes en la fracción GLB los de mayor peso molecular, como se observó en los perfiles electroforéticos y cromatográficos. Los resultados obtenidos por DSC, espectroscopía de fluorescencia (FI) e hidrofobicidad superficial, demuestran que la fracción GLB de CC presentó una estructura más compacta y menos flexible que la fracción ALB. Los aislados proteicos de CC presentaron propiedades físico-químicas y perfiles electroforéticos más relacionados a la fracción GLB que a la fracción ALB, aun luego de los cambios conformacionales provocados por el pH de extracción. Si bien A11

Resumen

presentó la mayor recuperación proteica, su solubilidad en distintos solventes fue baja, con una mayor presencia de agregados proteicos.

Se seleccionó el aislado A8 por sus características de solubilidad, hidrofobicidad y color para evaluar la influencia del pH y la fuerza iónica en sus propiedades fisico-químicas y funcionales. Se ensayaron cuatro condiciones de pH (2,1; 3,9; 6,3 y 8,3) y dos condiciones de fuerza iónica (μ) (0,10 y 0,54). Tanto el pH como μ no influyeron en la composición polipeptídica de la fracción soluble de A8, excepto a pH 3,9 ($\mu=0,10$) donde los polipéptidos característicos de vicilinas estaban ausentes por su baja solubilidad ($S_0 < 10\%$). Sin embargo, las proteínas de A8 sufrieron cambios conformacionales debido al pH y fuerza iónica, los cuales se vieron reflejados en FI y DSC. A baja fuerza iónica ($\mu=0,10$), fue evidente una mayor desnaturalización de las proteínas a pH por debajo de punto isoeléctrico (pI) de A8 (pH 4,5-5,0). Cuando la fuerza iónica del medio fue mayor ($\mu=0,54$), los cambios conformacionales debidos a la variación del pH resultaron menores (DSC, FI), lo cual fue evidente en el perfil de S_0 dado que varió en un rango menor (50-80%) en comparación con el encontrado a baja fuerza iónica (5-96%). Además, se encontró que las dispersiones de A8 disminuyeron la tensión interfacial en las interfases aceite/ agua (o/w) y aire/agua (a/w) en una magnitud similar y con ligeras diferencias de acuerdo con el pH y fuerza iónica del medio.

Se prepararon dispersiones de A8 para estudiar el efecto del pH y la fuerza iónica en sus propiedades emulsionantes, espumantes y gelificantes. Se obtuvieron emulsiones o/w utilizando diferentes concentraciones de proteínas (0,5; 1,0; 1,5 y 2,0% p/p). En general, las emulsiones permanecieron estables en un período de siete días a partir de 1,0% p/p. La mayoría de las emulsiones mostraron una distribución de tamaño de partícula monomodal. Las emulsiones a pH 8,3 presentaron las gotas más pequeñas mientras que las de mayor tamaño se encontraron a pH 3,9, independientemente de la fuerza iónica del medio. Con el aumento de la fuerza iónica el tamaño de las gotas se incrementó. De acuerdo con los valores del diámetro promedio en superficie ($D_{3,2}$), la concentración crítica de proteínas fue diferente de acuerdo con el pH y la fuerza iónica de la emulsión, y varió entre 1,5 y 2,0% p/p a baja fuerza iónica mientras que se encontró entre 1,0 y 1,5% p/p a alta fuerza iónica. Se estudiaron los índices de floculación (IF) y de coalescencia (IC) y, si bien la mayoría de las emulsiones presentaron diferentes grados de floculación, en muchas de las emulsiones la presencia de flóculos resultó favorable para la estabilidad de las emulsiones durante los siete días de almacenamiento analizados. Fenómenos de coalescencia fueron evidentes a pH 3,9 a baja fuerza iónica, relacionados principalmente a

la baja So de A8 en estas condiciones. Con el aumento de la fuerza iónica, mejoró la estabilidad de las emulsiones a pH 3,9.

Para la formación de espumas se trabajó con dispersiones de A8 al 0,1 y 0,5% p/p y se evaluó la estabilidad de las espumas obtenidas durante 8 minutos. A baja fuerza iónica, al 0,1% p/p las dispersiones a pH 2,1 presentaron una mejor capacidad de formación de espuma mientras que a pH 3,9 la capacidad espumante fue muy baja. Cuando la concentración de proteína aumentó a 0,5% p/p, la capacidad espumante sería independiente del pH, a pesar de las diferencias encontradas en el tamaño y forma de las burbujas presentes en cada espuma. A esta concentración, las espumas obtenidas a pH 6,3 y pH 8,3 fueron las más estables en el tiempo analizado. Al aumentar la fuerza iónica, la capacidad de formación de espuma de las proteínas de A8 empeoró en el rango de pH evaluado, excepto a pH 3,9 (0,1% p/p). A este pH, es mayor la cantidad de proteína disponible para migrar a la interfase a/w ($So > 50\%$), lo cual permite incorporar mayor líquido a las espumas formadas. En condiciones de alta fuerza iónica, el líquido incorporado en las espumas fue menor en comparación al incorporado a baja fuerza iónica, y las burbujas formadas colapsaron en menor tiempo. Los datos obtenidos se ajustaron a un modelo bifásico exponencial de primer orden para estudiar los procesos de desestabilización.

Se determinó la mínima concentración de gelificación (LGC) de A8 variando el pH y la fuerza iónica del medio y se seleccionaron dos concentraciones de proteína (8,0 y 10,0% p/p) para el estudio del proceso térmico de gelificación. Además, se realizaron ensayos de capacidad de retención de agua (WHC), color y perfil de textura (TPA). A baja fuerza iónica, la capacidad de gelificación de las proteínas de A8 fue menor a pH 2,1 y 3,9, obteniéndose geles débiles. Los geles obtenidos a pH a 6,3 y 8,3 presentan espectros mecánicos característicos de geles fuertes y poseen mayor capacidad de retención de agua. Al aumentar la fuerza iónica del medio, la formación de geles se vio favorecida a pH 2,1 y 3,9. En cuanto al color, los geles presentaron distintas tonalidades de marrón, guardando relación con el pH del medio, principalmente. Los geles de mayor dureza se obtuvieron a pH 6,3 y los más adhesivos a pH 2,1 cuando la fuerza iónica del medio fue baja. Con el aumento de la fuerza iónica, la mayor dureza se encontró en los geles obtenidos a pH 3,9 y la mayor cohesividad a pH 8,3.

El presente estudio contribuye al entendimiento de la influencia del pH en la extracción alcalina sobre la composición y estructura de las proteínas de CC. Los resultados obtenidos permiten concluir que tanto el pH como la fuerza iónica del medio constituyen una manera eficaz de modificar la estructura y conformación de las proteínas

Resumen

de A8 y con ello su capacidad de formación y estabilización de emulsiones y espumas, así como su capacidad de gelificar. Además, el variado comportamiento encontrado debido a las distintas condiciones de pH y fuerza iónica y de la concentración de proteínas, permitiría en principio el uso de estas proteínas en distintos sistemas alimentarios. De esta manera se promueve una mayor investigación en torno al uso de proteínas de fuentes alternativas como lo son las semillas de CC.

Capítulo I

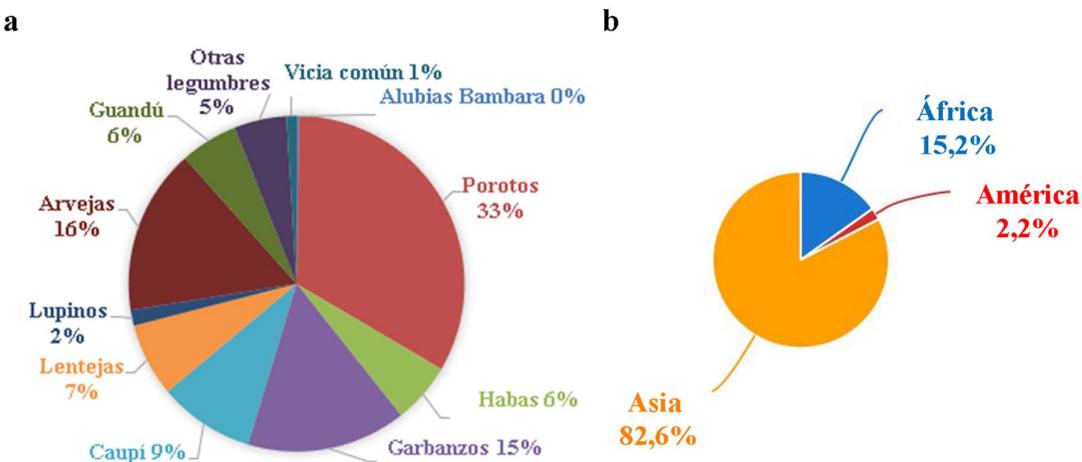
Introducción

I.1. El guandú. Historia y situación actual

El género *Cajanus* pertenece a la subtribu Cajaninae, tribu Phaseoleae, subfamilia Papilionoideae, familia Fabaceae (*Leguminosae*) (Sameer Kumar y col., 2017). *Cajanus cajan* (CC) recibe diversos nombres comunes alrededor del mundo, entre los cuales se encuentran: guandú, frijol de palo, guandul, kumanda yvyra'i, quinchoncho, feijão-guandu, red gram, congo pea, pigeon pea, yellow dal, entre muchos otros (Castillo-Gomez y col., 2016; Navarro y col., 2014; Sameer Kumar y col., 2017).

Cajanus cajan (L.) Millspaugh es una leguminosa cuyo origen es incierto y muchas veces disputado, aunque existe evidencia arqueológica de su origen en la India. Los historiadores postulan que desde India se distribuyó hacia Egipto y China mediante los mercaderes de la época (Fuller y col., 2019; Mula y Saxena., 2010). Hacia el siglo XVII, llega a América desde África a través de las rutas de esclavos, donde los registros históricos indican que los granos eran utilizados para alimentar palomas en la isla de Barbados, y de ahí viene su nombre común en inglés (*pigeon pea*) (FAO, 2018).

Actualmente, se cultivan aproximadamente 5 millones de hectáreas, siendo la sexta legumbre más cultivada del mundo (FAOSTAT, 2021) (Fig. I.1a). El 85% de la producción mundial está en India, que también es el principal consumidor; además es cultivado y consumido ampliamente en países subdesarrollados del sureste de Asia, África, América Central y América del sur (Fuller y col., 2019; Maheshwaran y col., 2019; Odny, 2007) (Fig. I.1b). En el continente americano, el Caribe es la subregión con mayor difusión de su cultivo, donde es un ingrediente importante de su gastronomía, seguido por Centroamérica y, en menor medida, por ciertas zonas de Sudamérica (FAO, 2018). En Argentina, es cultivado en pequeña escala en las provincias de Misiones, Chaco, Formosa, Corrientes y Salta (Paredes y Bogado, 2015).



En la última década, CC ha sido reconocido como un importante cultivo para la agricultura de subsistencia especialmente debido a su tolerancia a las sequías, a su habilidad de recuperarse de pérdidas causadas por varios factores de estrés tanto bióticos como abióticos y por ser una de las legumbres que mayor cantidad de nitrógeno produce por unidad de biomasa vegetal (Mula y Saxena, 2010). El genoma de CC ha sido secuenciado, convirtiéndose en uno de los primeros cultivos no industrializados en tener publicado su genoma (Varshney y col., 2012). Más de 100 genes únicos de esta legumbre han sido asociados a su capacidad de resistir el estrés producto de la sequía, ganando importancia para contribuir con la seguridad alimentaria en las áreas que enfrentan los primeros efectos del cambio climático global (ICRISAT: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 2021).

I.2. Características generales y usos

Botánicamente, es una leguminosa arbustiva y leñosa de porte erecto y perenne (Fig. I.2a y 2b) que puede vivir por un período de 3 a 5 años, pero comúnmente se lo utiliza como cultivo anual. Crece en una amplia variedad de tipos de suelo y climas, en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo desde el sur de Asia hasta Australia (límite latitudinal 30°, Norte y Sur). Al ser una planta tropical, prefiere climas calurosos y húmedos, pero puede soportar temperaturas cercanas al punto de congelamiento. Presenta raíces de hasta 3 m de profundidad y de rápido crecimiento, gracias a lo cual puede resistir períodos de sequía y condiciones de suelos pobres, dándole la capacidad de crecer en ambientes marginales y producir granos en aquellas tierras en las que la mayoría de los

cultivos no podrían sobrevivir. Los frutos son vainas de color verde o con estrías moradas, generalmente indehiscentes, planas y oblongas (5 a 13 cm de largo por 1,2 a 1,7 cm de ancho), que están deprimidas profundamente en los septos, entre las 2 a 9 semillas que contiene (Fig. I.2c). Las semillas son de aspecto redondo u oval, de 6 a 8 mm de largo por 4 a 7 mm de ancho, y su color varía entre crema, pasando por diferentes variaciones de amarillo, rojo, marrón y hasta negro (Fig. I.2d).

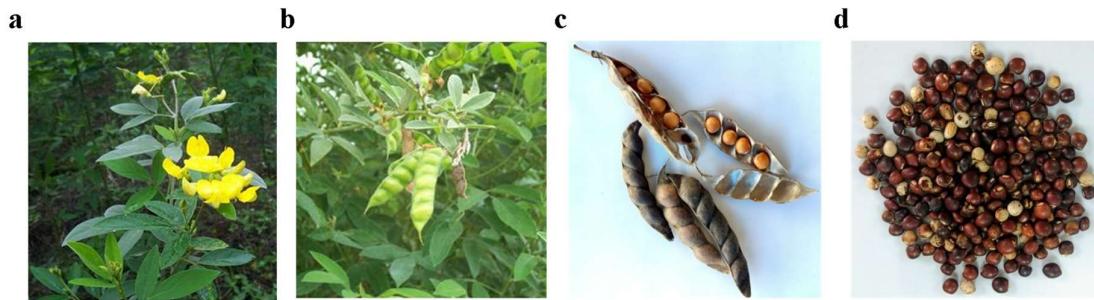


Figura I.2: Cultivo de *Cajanus Cajan* (CC) **a)** en plena floración, **b)** con frutos en diferente estado de maduración, **c)** Vainas con semillas, **d)** Semillas (Estación Experimental El Sombrero-Corrientes - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-INTA).

Si bien, CC se encuentra sexta en la producción mundial en comparación con otras legumbres como porotos (*Phaseolus vulgaris*), arvejas (*Pisum sativum*) y garbanzos (*Cicer arietinum*), su uso está más diversificado que cualquier otra legumbre (Mula y Saxena, 2010). Entre ellos se encuentran su uso en alimentación humana y animal, como cultivo de cobertura y abono verde, como reparo del viento para otros cultivos o estructuras, como cerco vivo para aves de corral y para la obtención de leña de consumo doméstico (Obala y col, 2019; Paredes y Bogado, 2015) (Fig. I.3).

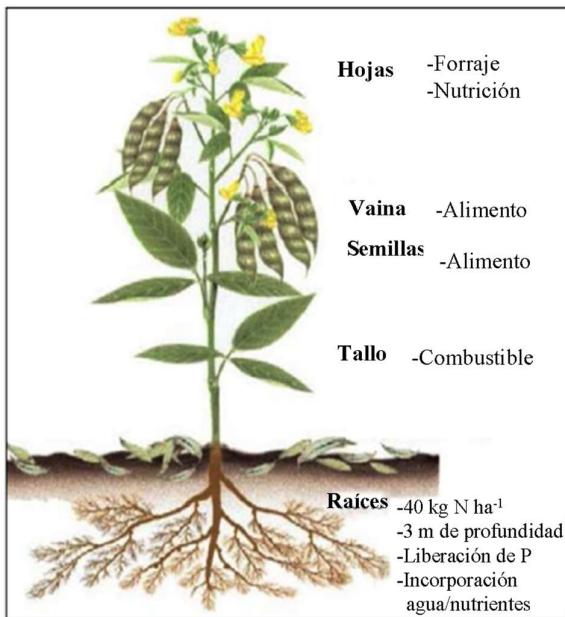


Figura I.3: Planta de *Cajanus cajan*. Fuente: Mula y Saxena (2010).

Como alimento humano, las semillas de CC se consumen verdes o secas, se pueden encontrar frescas, enlatadas o congeladas (Mula y Saxena, 2010). Las semillas maduras y secas se retiran de la vaina y se cocinan para la preparación de sopas espesas o guisos, o para acompañar distintos platos, además pueden ser molidas y utilizadas en la preparación de *noodles*, y como aditivo de harinas para la elaboración de pastas o productos de panadería (Mula y Saxena, 2010) sin alterar las propiedades sensoriales (Torres y col., 2007).

Debido a su capacidad de rebrote rápido se lo emplea para la obtención de forraje (mediante cortes frecuentes) de muy buena calidad, ya sea para consumo directo o para la confección de henos o silos para la alimentación del ganado (Paredes y Bogado, 2015). Además, las semillas se utilizan como parte de la dieta de aves y cerdos (Mula y Saxena, 2010).

I.3. Composición de la semilla

Las legumbres son una importante fuente nutritiva y balanceada de calorías y proteínas, por lo cual resultan interesantes desde la perspectiva de la seguridad alimentaria, especialmente en regiones semi-áridas (Varshney y col., 2012). Así, las comidas que contienen legumbres resultan de gran importancia en la dieta humana, constituyendo la principal fuente de proteínas vegetales (Talari y Shakappa, 2018). Como fuente de alimento, CC provee proteínas dietarias para más de mil millones de personas en todo el

mundo (Krishnan y col., 2017). Además, es un cultivo del tipo *commodity* que contribuye al sostén de millones de agricultores de escasos recursos en Asia y África (Mula y Saxena, 2010).

Las semillas de CC están compuestas por los cotiledones (85%), la cubierta (14%) y el embrión (1%), conteniendo una variedad de nutrientes dietarios. Los cotiledones son ricos en carbohidratos (66,7%) mientras que la mayor proporción de proteínas (cerca del 50%) se encuentra en el embrión. Aproximadamente un tercio de la cubierta está formada por fibra. En los cotiledones y el embrión, las cantidades de aminoácidos azufrados como metionina y cisteína se encuentran en alrededor del 1% (Sameer Kumar y col., 2017). La composición porcentual de las semillas de CC se encuentra resumida en la Tabla 1.

Tabla I.1: Composición química de la semilla de *Cajanus cajan*.

Nutriente	% p/p
Humedad	2,3-10,2
Cenizas*	2,9-3,7
Proteínas*	19,2-23,5
Lípidos*	1,8-4,4
Hidratos de carbono*	34,1-56,0
Fibra cruda*	7,2-15,8

*porcentaje en base seca. Fuentes: Acevedo y col. (2013), Akande y col. (2010), González Foutel y col. (2014), Khatoon y Prakash (2006), Praderes y col. (2009).

Los componentes principales de la semilla son los hidratos de carbono (50% p/p almidón) y las proteínas (19,2-23,5% p/p). La calidad de las proteínas está determinada por su digestibilidad y su contenido de aminoácidos. Entre los aminoácidos más abundantes se encuentran el ácido aspártico y el ácido glutámico; en cuanto a los aminoácidos esenciales, encontramos que fenilalanina, lisina y treonina están en buena proporción, mientras que metionina y cisteína se encuentran por debajo de los requerimientos nutricionales recomendados (Oshodi y col., 1993; Singh y Jambunathan, 1982). La fracción lipídica es baja (1,8-4,4% p/p) y contiene 5,7% de ácido linolénico, 51,4% ácido linoleico, 6,3% de ácido oleico y 36,6% de triacilgliceroles saturados. Es una buena fuente de minerales dietarios como calcio, fósforo, magnesio, azufre y potasio. Además, aporta vitaminas hidrosolubles como tiamina, riboflavina y niacina (Odeny, 2007).

Como la mayoría de las legumbres, CC también contiene factores antinutricionales que incluyen oligosacáridos (rafinosa, estaquiosa, verbascosa), polifenoles (fenoles,

Capítulo I

taninos), ácido fítico, fitolectinas e inhibidores de enzimas (amilasa y tripsina) (Saxena y col., 2002). Las semillas de color marrón contienen el triple de polifenoles en relación con los cultivares de semillas blancas o crema, al igual que mayor actividad inhibitoria de enzimas (Singh, 1984). Algunos de estos factores antinutricionales son sensibles al calor y se destruyen durante la cocción (Fasoyiro y col., 2005; Khandelwal y col., 2010).

I.4. Proteínas

Las semillas de legumbres acumulan grandes cantidades de proteínas durante su desarrollo y en general la mayoría carece de actividad catalítica, cumpliendo un rol no estructural en el parénquima de los cotiledones (Oomah y col., 2011), donde se almacenan en cuerpos proteicos (estructura semejante a las vacuolas). Las proteínas sobreviven a la desecación durante la maduración de la semilla y sufren hidrólisis durante la germinación, proporcionando una fuente de precursores de esqueleto de carbono. Las proteínas pueden clasificarse en proteínas metabólicas (enzimáticas y no enzimáticas) o de almacenamiento. Muchas de las proteínas de almacenamiento son proteínas globulares debido a la forma que adquieren y requieren una cierta proporción de fuerza iónica para ser solubles en medio acuoso (Oomah y col., 2011). Las fracciones proteicas mayoritarias en legumbres son albúminas (ALB) (10-15%) y globulinas (GLB) (50-70%), mientras que en menor proporción se encuentran prolaminas y glutelinas.

La fracción ALB es soluble en agua y comprende proteínas enzimáticas, inhibidores de proteasas, inhibidores de amilasa y lectinas. El peso molecular de estas proteínas varía entre 5 y 80 kDa (Boye y col., 2010). En las semillas de CC, la fracción ALB se caracteriza por su mayor contenido en aminoácidos azufrados, lisina, ácido aspártico, glicina y alanina (Singh y Jambunathan, 1982; Singh y col., 1990).

La fracción GLB constituye el grupo de proteínas de almacenamiento más ampliamente distribuido; está presente no solo en plantas dicotiledóneas (como las legumbres) sino también en monocotiledóneas (por ejemplo, los cereales) (Templeman y col., 1987). Basados en su coeficiente de sedimentación, se dividen en GLB del tipo vicilina (7S y 8S) y GLB del tipo legumina (11S y 12S). Ambos grupos muestran una variación considerable en sus estructuras, que resultan en parte del procesamiento postraduccional. Las vicilinas se organizan en trímeros, cada uno de los cuales presenta una masa entre 150-200 kDa, distinguiéndose dos tipos de subunidades, unas de masa molecular entre 70-80 kDa y otras de 50 kDa que no están unidas por enlaces disulfuro (Shewry y col., 1995). Las leguminas se organizan por hexámeros, los cuales están

formados por subunidades de masa molecular entre 50-70 kDa que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Cada subunidad, a su vez, está conformada por un polipéptido ácido de masa molecular entre 30-40 kDa y un polipéptido básico de alrededor de 20 kDa, unidos por un enlace disulfuro. Además, ambos tipos de GLB se caracterizan por su deficiencia en cisteína y metionina, aunque legumina 11S contiene niveles ligeramente más altos de estos aminoácidos. En CC, las proteínas más abundantes poseen una masa molecular de 64 y 47 kDa, las cuales representan las 2 subunidades de vicilina 7S, mientras que las proteínas del tipo legumina 11S no son abundantes (Krishnan y col., 2017).

Hasta el momento, hay escasa información sobre las propiedades físico-químicas (estabilidad térmica, hidrofobicidad) y estructurales de las proteínas mayoritarias de CC, especialmente acerca de la fracción ALB. En cuanto a la fracción GLB, se han encontrado trabajos sobre su fraccionamiento, purificación de vicilinas 7S y la secuenciación N-amino terminal de sus subunidades (Krishna y col., 1977; Krishna y Bhatia, 1985, Mawal y col., 1990). Por otra parte, Prema y Kurup (1973) reportaron acción hipolipidémica de la fracción GLB en ratas alimentadas con una dieta ricas en grasa y en colesterol.

I.4.1. Aislados proteicos

La industria alimentaria busca permanentemente proteínas alternativas que puedan competir con las que dominan el mercado y que posean características nutritivas, funcionales y sensoriales adecuadas para el desarrollo de nuevos productos. En este sentido, las proteínas vegetales constituyen una opción atractiva, dada la tendencia de los consumidores a reemplazar proteínas de origen animal por proteínas de origen vegetal (Tanger y col., 2020). Esta tendencia se explica no solo teniendo en cuenta aspectos relacionados a la salud, sino también a cambios culturales profundos vinculados al cuidado del medioambiente a través del consumo sustentable de recursos. Además del creciente aumento de consumidores vegetarianos y veganos, se reconoce que el incremento del consumo de proteínas vegetales en la alimentación humana constituiría una estrategia válida para reducir la huella de carbono de la producción animal (Ivanova y col., 2020; Momen y col., 2021; Pojic y col., 2018). Un ejemplo de esta tendencia es la creciente oferta en el mercado mundial de productos análogos de la carne de origen vegetal (Singh y col., 2021).

En la industria alimentaria, las proteínas vegetales se encuentran disponibles comercialmente en cuatro formas: harinas, concentrados y aislados proteicos, proteínas

Capítulo I

texturizadas. Para la obtención de productos proteicos ($> 80\%$ de proteína), existen diferentes metodologías, entre las cuales se encuentran la extracción alcalina-precipitación isoeléctrica, la extracción salina-diálisis, la ultrafiltración y la precipitación micelar. El método de extracción, así como las condiciones en las que se realiza (pH, temperatura, contenido de sales) puede afectar la funcionalidad de las proteínas ya que se altera no solo su estructura (conformación y carga superficial), sino también su composición, lo cual en conjunto lleva a obtener productos con diferentes funcionalidades (Cui y col., 2020). Por ejemplo, aquellos obtenidos por precipitación isoeléctrica están compuestos principalmente por GLB mientras que los obtenidos por extracción salina resultan en una mezcla de ALB y GLB (Stone y col., 2015). Por lo tanto, la selección de las condiciones adecuadas de extracción es imperativo para su aplicación en productos alimenticios.

En los procesos tecnológicos que involucran la obtención de aislados proteicos vegetales, independientemente de la metodología de extracción utilizada, el primer paso siempre consiste en la solubilización de las proteínas. En este sentido, el método por extracción alcalina-precipitación isoeléctrica es una de las técnicas más utilizadas para extraer proteínas de plantas y semillas debido a su simplicidad, rapidez y bajo costo (Perović y col., 2020). Este proceso de extracción se basa en solubilizar las proteínas en un medio alcalino (pH 8,0-12,0), separando los residuos insolubles (principalmente carbohidratos) mediante centrifugación, y luego separando las proteínas solubles de otros componentes solubles ajustando el pH a su punto isoeléctrico (pH 4,0-5,0) (Horax y col., 2004; Jarpa-Parra y col., 2014; Liu y col., 2011; Mwasaru y col., 1999a; Tanger y col., 2020). El rendimiento de extracción de las proteínas varía de acuerdo con las condiciones operacionales, entre las que se encuentran la relación harina/solvente, tiempo, temperatura y pH, siendo este último factor el más importante. Además de favorecer la solubilización de las proteínas, el medio alcalino permite la difusión de estas al solvente, mediante la ruptura de la pared celular debido a una reducción en la tensión superficial, eliminación parcial de la lignina y alteración de la estructura de la hemicelulosa (Sari y col., 2015).

Desde el punto de vista nutricional, se han informado algunos efectos negativos a pH alcalinos extremos. Entre estos se encuentran, la racemización de L-aminoácidos a la forma D-, la formación de lisinoalanina (aminoácido tóxico) (Deleu y col., 2019; Sari y col., 2015) y la oxidación de compuestos polifenólicos a quinonas, resultando en aislados proteicos de color oscuro (Momen y col., 2021).

La estructura de las proteínas puede modificarse (desnaturalizarse) durante el proceso de extracción alcalina, y subsecuentemente, sus propiedades tecnofuncionales. La

variación del pH puede llevar a un aumento de solubilidad proteica o bien a la formación de agregados proteicos. A pH alcalinos extremos se ionizan los grupos sulfhidrilos, fenólicos y carboxílicos, aumentando las fuerzas repulsivas entre las cadenas polipeptídicas, con una mayor exposición de regiones hidrofóbicas y grupos sulfhidrilos libres. En algunas ocasiones, puede ocurrir hidrólisis de la cadena peptídica, donde los fragmentos más pequeños pueden unirse a través de interacciones hidrofóbicas o puentes disulfuro intermoleculares, dando lugar a la formación de agregados proteicos insolubles (Damodaran, 2010; Momen y col., 2021).

Una proteína desnaturalizada implica que su estructura se aleja de su forma nativa debido a un importante cambio en su conformación tridimensional (modificaciones en su estructura secundaria, terciaria o cuaternaria), generalmente se ven afectadas las interacciones no-covalentes (responsables de la estabilización de la estructura, así como de la relación de dicha estructura con el solvente) y en algunas ocasiones también se ven afectados los puentes disulfuro. La desnaturalización puede ser deseable para elevar la digestibilidad de las proteínas o para mejorar su funcionalidad, por ejemplo, cuando se mejoran las propiedades de espumado y emulsificación por el desdoblamiento de las moléculas que favorece la estabilización en interfases al lograr la exposición de sitios hidrofóbicos que interaccionan con la fase orgánica o hidrofóbica de una emulsión.

Mizubuti y col. (2000) optimizaron las condiciones de extracción alcalina de proteínas de CC (pH 8,5, sin NaCl). Mwasaru y col. (1999a y b) analizaron la influencia del pH en la obtención de aislados proteicos de CC por extracción alcalina y posterior precipitación isoeléctrica, seguido de un secado a 50 °C (48 h). Adenekan y col. (2018) ensayaron diferentes solventes para la obtención de proteínas de CC por precipitación y evaluaron sus propiedades nutricionales y funcionales. Por otro lado, CC no es utilizado como una fuente de proteínas en la obtención de aislados y concentrados proteicos para ser incorporados en sistemas alimentarios, incluso en los países donde crece abundantemente (Tapal y col., 2019).

I.5. Propiedades tecnofuncionales

La funcionalidad de una sustancia se define como toda propiedad no nutricional, que interviene en su utilización. Este comportamiento depende de las propiedades físicas y químicas que se afectan durante el procesamiento, almacenamiento, preparación y consumo del alimento (Fligner y Mangino, 1991). Lorient y col. (1988) definen las propiedades tecnofuncionales como “*La expresión y participación de las fuerzas*

Capítulo I

fisicoquímicas en relación con las propiedades sensoriales de los alimentos que las contienen” y Cheftel y col. (1989) como “*Toda propiedad no nutricional de un alimento, que repercuta mayoritariamente sobre su carácter sensorial*”. Las propiedades tecnofuncionales de una sustancia son de importancia tecnológica ya que repercuten directamente en la calidad del producto final. Las propiedades tecnofuncionales que presentan las proteínas permiten su uso como ingrediente en mezclas complejas para lograr el desarrollo de nuevos productos alimenticios.

Dentro de las características que influyen en la funcionalidad de las proteínas se encuentran el tamaño, forma, carga neta y polaridad de las moléculas, las interacciones con otros componentes alimentarios, así como parámetros físicos como el pH, la fuerza iónica, la naturaleza del solvente o las distintas modificaciones a las que son expuestas para obtener una determinada matriz alimentaria (Kannan y col., 2012). En este último punto, es importante destacar que el procesamiento de la materia prima modifica la estructura nativa de las proteínas, y no solo pueden verse alteradas las propiedades tecnofuncionales de las mismas, sino también su valor nutricional, la disponibilidad de componentes bioactivos o su potencial alergénico. Es así como se vuelve necesario comprender las características estructurales y fisicoquímicas de las proteínas para el diseño racional de ingredientes proteicos con una funcionalidad específica para el desarrollo de alimentos con determinadas características nutricionales y sensoriales (Pilosof y Bartholomai, 2000).

El conocimiento de la composición y secuencia de aminoácidos permite deducir y/o predecir de manera aproximada propiedades fisicoquímicas como hidrofobicidad, hidrofilicidad, tamaño, forma, carga neta, distribución de la carga y actividad superficial. Las mismas a su vez determinan las propiedades tecnofuncionales, como espumado, gelificación, formación de películas o estructuras vítreas, capacidad para ligar agua o aceite, emulsificación, etc. La funcionalidad de una proteína no está del todo comprendida, los modelos de predicción de propiedades tecnofuncionales a partir de la información sobre sus aminoácidos todavía son limitados. La consideración de parámetros, como la relación hidrofobicidad/hidrofilicidad, estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria, flexibilidad/rigidez molecular y capacidad para interactuar/reaccionar con otros compuestos resultan cruciales para el mejor modelado, así como para el desarrollo de nuevas aplicaciones (Badui Dergal, 2013).

Las propiedades tecnofuncionales de las proteínas pueden interpretarse empíricamente como una manifestación de dos aspectos moleculares: a) las propiedades hidrodinámicas, y b) propiedades de la proteína relacionadas con su superficie. Cheftel y

col. (1989) consideran tres grandes grupos, según el tipo de interacción que predomina en el sistema:

-Propiedades relacionadas con interacciones proteína-agua: absorción de agua, humectabilidad, capacidad de hinchamiento, capacidad de retención de agua, adhesividad, dispersabilidad, solubilidad y la viscosidad como propiedad hidrodinámica.

-Propiedades relacionadas con interacciones proteína-proteína: precipitación, gelificación, formación de estructuras como pueden ser la formación de masa, de fibras, de películas, la adhesión y la cohesión.

-Propiedades de superficie o interfase: emulsificación y espumado.

En realidad, estos grupos de propiedades están interrelacionados; por ejemplo, la gelificación involucra no solamente interacciones proteína-proteína sino también proteína-agua, en tanto la viscosidad y la solubilidad dependen de las relaciones entre proteína-agua y proteína-proteína.

Solubilidad

Las propiedades tecnofuncionales de proteínas tales como hinchamiento, espumado, emulsificación y gelificación a menudo se ven afectadas por la solubilidad de las mismas. La solubilidad de una proteína es la manifestación termodinámica del equilibrio entre las interacciones proteína-proteína y solvente-proteína, que a su vez dependen de la hidrofobicidad y naturaleza iónica de las mismas. Las proteínas insolubles tienen un uso muy limitado en alimentos (Baudi Dergal, 2013). El primer paso en la solubilización de las proteínas es la solvatación, la cual depende tanto de factores intrínsecos como extrínsecos. Proteínas con un gran área superficial, una alta carga superficial y una estructura molecular abierta se espera que sean fácilmente solvatadas en medios acuosos y, por lo tanto, efectivamente solubilizadas (Sathe, 2012).

El pH del medio influye en la solubilidad de las proteínas dado que la carga eléctrica de las proteínas se ve fuertemente influenciada. Típicamente, un proteína tiene una carga neta igual a cero en su punto isoelectrónico (pI), y cuando pH=pI la solubilidad es mínima. En los valores de pH por encima y por debajo del pI, las proteínas tienen una carga neta positiva o negativa, respectivamente, lo cual favorece su solubilización. Existen proteínas alimenticias como la como β -lactoglobulina (pI 5,2) y albúmina sérica bovina (pI 5,3), que son altamente solubles en su pI, porque no hay repulsión electrostática y contienen una alta concentración de residuos hidrofílicos en su superficie comparados con

Capítulo I

los no polares. En el pI, si la hidrofilicidad y las fuerzas de repulsión por hidratación provenientes de estos residuos cargados son mayores que las interacciones hidrofóbicas proteína-proteína, la molécula se mantendrá soluble (Baudi Dergal, 2013).

La presencia de sales, orgánicas e inorgánicas, afecta la solubilidad proteica. Cuando la fuerza iónica (μ) de la sal en solución es baja ($\mu < 0,5$), la carga superficial de las proteínas se neutraliza. Como consecuencia, la solubilidad de las proteínas puede aumentar o disminuir dependiendo de la proporción de regiones polares y no polares. La solubilidad disminuye para proteínas que contienen una alta proporción de zonas no polares y se incrementa para aquellas que no (Sathe, 2012). El descenso en la solubilidad es causado por el incremento de las interacciones hidrofóbicas, en tanto la mayor solubilidad se debe a un descenso en la actividad iónica de la molécula. Cuando la fuerza iónica del medio es mayor a 1, el efecto depende del tipo de sal (serie de Hofmeinster).

I.5.1. Propiedades superficiales de las proteínas

Diversos productos alimenticios son tipo espuma o tipo emulsiones, donde estos sistemas dispersos son inestables a menos que estén presentes sustancias anfifílicas en la interfase. Las proteínas, al ser moléculas anfifílicas, pueden llevar a cabo la estabilización al migrar espontáneamente a la interfase aire-agua o a la interfase agua-aceite puesto que su energía libre es menor en la interfase que en la zona acuosa. Las propiedades de actividad superficial de las proteínas no solo dependen de la relación hidrofobicidad/hidrofilicidad sino de la conformación proteica, ya que están definidas por la relación estabilidad/flexibilidad de la cadena polipeptídica y su adaptabilidad a los cambios en el medio ambiente, así como la distribución de los grupos hidrofóbicos e hidrofilicos en la superficie de las proteínas.

Las proteínas presentan en su superficie activa tres atributos deseables: (a) capacidad para adsorberse rápidamente en una interfase, (b) capacidad para desplegarse rápidamente y reorientarse en una interfase y (c) capacidad aún en la interfase para interactuar con moléculas vecinas y formar películas viscoelásticas. Si el número de zonas hidrofóbicas es alto y están distribuidas como parches con suficiente energía para interactuar, la adsorción espontánea hacia la interfase será más probable. El número de segmentos peptídicos de una proteína anclados en la interfase depende, en parte de la flexibilidad de la molécula. La facilidad con la que la proteína se despliegue (por ejemplo, se desnaturalice) para exponer sus dominios hidrofóbicos afectará sus propiedades emulsificantes y espumantes.

Si bien los principios básicos involucrados en la formación y estabilidad de emulsiones y espumas son muy similares, difieren en los tipos de interfases, por lo que una proteína que es un buen agente emulsificante puede no ser un buen agente espumante.

1.5.1.1. Propiedades emulsionantes

Una emulsión consiste en dos líquidos inmiscibles (usualmente agua y aceite), donde uno de los líquidos se encuentra disperso en el otro en forma de pequeñas gotas. En la mayoría de los alimentos, el diámetro promedio de estas gotas se encuentra entre 0,1 y 100 μm (McClements, 2016). El líquido que se encuentra en forma de gotas es referido como fase dispersa, fase interna o fase discontinua, mientras que el líquido que rodea las gotas se denomina fase continua o fase externa. Las emulsiones convencionalmente se clasifican de acuerdo con la distribución espacial de la fase acuosa y oleosa. Un sistema que contiene gotas de aceite dispersas en una fase acuosa se denomina emulsión aceite en agua (o/w), por ejemplo, leche, crema, mayonesa, aderezos, bebidas, sopas y salsas; mientras que un sistema donde el agua se encuentra dispersa en una fase oleosa se llama emulsión agua en aceite (w/o), como lo son la manteca y margarina. Las emulsiones son comúnmente utilizadas en alimentos naturales o procesados, pero también ha aumentado su uso como sistema de *delivery* para encapsular, proteger y liberar ingredientes funcionales.

Si se considera que en la interfase entre dos líquidos inmiscibles (A y B) se produce una tensión interfacial (γ), expresada como mN/m o dinas/cm , y viene dada por:

$$\gamma = \gamma_A + \gamma_B - 2 \times \gamma_{AB} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde γ_A y γ_B son las tensiones interfaciales de los líquidos A y B, y γ_{AB} es la tensión resultante de la interacción molecular entre ambas fases. La variación de la energía libre de Gibbs (ΔG) del sistema está dada por la ecuación 2:

$$\Delta G = \gamma \times \Delta A \quad (\text{Ec. 2})$$

donde ΔA es el área superficial o interfacial.

Durante la formación de emulsiones hay un aumento del área superficial, lo que produce un incremento de la energía libre del sistema y, como consecuencia de ello, las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables que con el tiempo tienden a separarse en la fase acuosa y la fase oleosa que las componen (Wagner, 2000). Sin embargo, es posible obtener emulsiones cinéticamente estables (metaestables) por un período de tiempo determinado (días, semanas, meses, o años) incluyendo sustancias llamadas estabilizadores, entre los cuales hay emulsionantes, modificadores de la textura, espesantes o inhibidores de la maduración (McClements, 2016). Las proteínas como

Capítulo I

surfactantes son las preferidas para formular emulsiones alimentarias (o/w), debido a que su superficie es activa y favorece la resistencia a la coalescencia. Para ser emulsionantes efectivos, las proteínas deben migrar rápidamente a la interfase y tener suficiente flexibilidad para desplegarse y ser absorbidas en ella. Además, deben tener la capacidad para interactuar con moléculas vecinas y formar un film viscoelástico que rodee las gotas de aceite y retrase los procesos de desestabilización de la emulsión durante su almacenamiento y manejo, lo que no puede lograrse cuando se emplean surfactantes de bajo peso molecular (Badui Dergal, 2013).

Proteínas como las caseínas son altamente flexibles por lo que pueden realizar rápidamente cambios conformacionales, favoreciendo la adsorción de nuevos polipéptidos en la interfase, contrario a lo que ocurre con proteínas globulares más rígidas como la lizosima y las proteínas de soja. Las proteínas vegetales típicamente forman films interfaciales más delgados que las proteínas lácteas (Day, 2013). Aislados proteicos de soja se han utilizado para obtener emulsiones o/w estables (McClements y col., 2017). Además, diversos estudios han demostrado el potencial como surfactantes que poseen las proteínas de arvejas, lentejas, garbanzo y porotos (Felix y col., 2018; Gumus y col., 2017; Karaca y col., 2011; Ladjal-Ettoumi y col., 2015; Lafarga y col., 2019; Sridharan y col., 2020).

Formación de la emulsión

La formación de una emulsión puede realizarse en un solo paso o en una serie de pasos consecutivos. El proceso de convertir dos líquidos inmiscibles en una emulsión se conoce como homogeneización y los equipos mecánicos utilizados en el proceso reciben el nombre de homogeneizadores. La homogeneización primaria consiste en convertir las dos fases en una emulsión, mientras que la homogeneización secundaria es la reducción del tamaño de gota de la emulsión preexistente. En muchos procesos de la industria alimentaria y en laboratorios de investigación es más eficiente preparar una emulsión utilizando dos pasos consecutivos.

Para crear una emulsión es necesario suministrar energía mecánica al sistema para la formación y posterior ruptura de las gotas, lo cual puede lograrse a través del uso de equipos como ser: agitadores rotatorios de alta velocidad, molinos coloidales, homogeneizadores de válvulas a presión, homogeneizadores por ultrasonido, o microfluidizadores.

Las emulsiones estabilizadas por proteínas se ven afectadas tanto por las propias características moleculares de la proteína como por factores intrínsecos, como el pH, la

fuerza iónica, la temperatura, la presencia de surfactantes de bajo peso molecular, de azúcares, el volumen de la fase oleosa, el punto de fusión del aceite empleado, así como los factores extrínsecos, como el tipo de equipo utilizado para formar la emulsión, velocidad de incorporación del aceite y el nivel de agitación. Esto dificulta la estandarización de los métodos y la comparación de resultados entre laboratorios.

Desestabilización de una emulsión

Existe una variedad de procesos fisicoquímicos que alteran las propiedades de las emulsiones y es útil determinar cuál de ellos está ocurriendo para poder diseñar estrategias efectivas que contribuyan a la estabilidad de la emulsión en el tiempo. Dentro de los procesos físicos se encuentran la separación gravitacional (cremado o sedimentación), la agregación de gotas (floculación y coalescencia), la maduración de Ostwald e inversión de fase (Fig. I.4). Entre los procesos químicos que pueden ocurrir se encuentran la oxidación lipídica, la hidrólisis enzimática y el crecimiento de microorganismos.

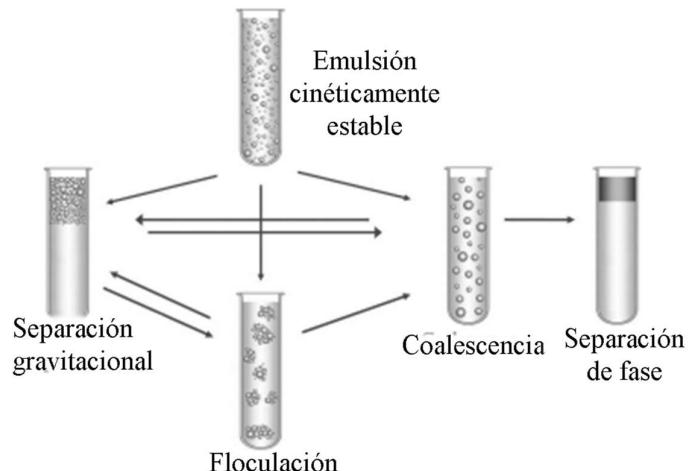


Figura I.4: Principales procesos de desestabilización en emulsiones o/w. Fuente: McClements (2016).

Separación Gravitacional

Las gotas en una emulsión tienen densidades diferentes con respecto al líquido que las rodea, y la fuerza de gravedad actúa sobre ellas. Si la densidad de las gotas es menor que la del líquido (emulsiones o/w), éstas tienden a moverse hacia la superficie y ocurre el cremado, mientras que si la densidad de las gotas es mayor (emulsiones w/o), migran hacia abajo y se produce la sedimentación de estas. La migración de las gotas ocurre a cierta velocidad (v) que se puede aproximar con algunas limitaciones por la ley de Stokes:

$$v_{Stokes} = \frac{2gr^2(\delta_2 - \delta_1)}{9\eta_1} \quad (\text{Ec. 3})$$

Capítulo I

donde g es la aceleración de la gravedad, r el radio de la partícula, δ es la densidad (los subíndices 1 y 2 corresponden a la fase continua y dispersa, respectivamente) y η a la viscosidad de la fase continua. De esta ley se desprende que la velocidad de migración de las gotas depende notablemente de su tamaño, las gotas más pequeñas lo harán más lentamente que las más grandes. Sin embargo, en el comportamiento real de las emulsiones existen muchas desviaciones de esta ley. Por ejemplo, la velocidad de cremado depende no solo del tamaño de las gotas sino también de la polidispersidad en el tamaño y de la concentración de estas, de su carga superficial y de la formación de flóculos. Así el cremado se ve efectivamente retardado cuando las gotas se encuentran más empaquetadas, o cuando existen fuerzas de repulsión entre las mismas, mientras que la presencia de flóculos puede favorecer o retardar el cremado (McClements, 2016).

Floculación

En una emulsión las gotas están en continuo movimiento, inducido por movimientos brownianos, gravitacionales o fuerzas mecánicas (como la agitación) y como resultado las gotas pueden colisionar, luego de lo cual pueden seguir en movimiento o agregarse. Uno de los tipos de agregación es la floculación donde dos o más gotas se unen, pero se mantiene la integridad del film interfacial, siendo este proceso reversible o irreversible. La apariencia, textura y estabilidad de las emulsiones están fuertemente relacionadas con las características de los flóculos formados (cantidad, tamaño, flexibilidad y empaquetamiento) (McClements, 2016). Los flóculos formados pueden tener una estructura abierta cuando las fuerzas atractivas entre las gotas son fuertes, cada gota está unida a dos o tres gotas de su alrededor y tienden a ocluir la fase acuosa más densa desacelerando el cremado. O bien, los flóculos pueden tener una estructura cerrada cuando las fuerzas que mantienen unidas las gotas son débiles, esto permite que una gota que se encuentre con el flóculo pueda acercarse a su centro y empaquetarse, este flóculo de estructura cerrada se comporta como una partícula de mayor tamaño y acelera la separación gravitacional. La velocidad de floculación depende de la frecuencia y la eficiencia de la colisión, que a su vez depende de la naturaleza de las interacciones que se den entre las gotas. Las distintas interacciones pueden ser del tipo *van der Waals*, estéricas, electrostáticas, hidrofóbicas, y por depleción (partículas coloidales no adsorbidas que causan interacciones atractivas entre las gotas) (Dickinson, 2003). La importancia de cada interacción en un sistema dado depende de los tipos de ingredientes presentes, de la microestructura de la emulsión y de las condiciones del medio.

Coalescencia

Es el proceso donde dos o más gotas se unen luego de colisionar para formar una gota de mayor tamaño. Es el principal mecanismo por el cual la emulsión se mueve hacia un estado termodinámicamente más estable porque se produce una disminución en el área de contacto entre la fase acuosa y la fase oleosa. El incremento en el tamaño de las gotas produce un aumento en la velocidad de cremado/sedimentación. La proporción y los mecanismos físicos por lo que ocurre la coalescencia dependen en gran parte de la naturaleza del emulsionante utilizado para estabilizar el sistema.

Cuando las gotas se acercan el film que las separa se vuelve delgado y las gotas pierden su forma esférica, adoptando formas poliédricas, esto sucede porque las fuerzas externas (fuerzas hidrodinámicas, mecánicas, gravitacionales y coloidales) son mayores a las fuerzas internas que mantienen la forma esférica de las gotas. Que se produzca coalescencia dependerá de la tendencia a la ruptura del delgado film que separa las gotas y puede deberse a diferentes causas:

- Huecos espontáneos en el film, por movimientos vibracionales térmicos de las moléculas del emulsificante, dicho hueco puede interaccionar con la superficie sin cubrir de otra gota y causar la coalescencia.
- Cantidad insuficiente de emulsificante, pueden quedar huecos en la membrana interfacial sin cubrir (principalmente durante la homogeneización).
- Estiramiento del film interfacial, por acción de fuerzas paralelas puede disminuir la concentración del tensioactivo en esa zona del film o bien producir su desgarramiento y abrir huecos en la superficie susceptibles de producir coalescencia (Ventureira, 2010).

Maduración de Ostwald

Es el proceso por el cual las gotas más grandes crecen a expensas de las más pequeñas debido al transporte de fase dispersa a través de la fase continua. El proceso no involucra agregación ni ruptura del film interfacial. La maduración de Ostwald ocurre debido a que la solubilidad de los componentes de la fase dispersa aumenta cuando el tamaño de gota disminuye, lo que produce un aumento en la concentración de los solutos, generándose un gradiente de concentración donde los solutos de las gotas pequeñas tienden a moverse hacia las gotas de mayor tamaño (McClements, 2016). Este proceso es prácticamente despreciable en las emulsiones o/w que conforman la mayoría de los productos alimenticios debido a la escasa solubilidad de los componentes de la fase oleosa

Capítulo I

en la fase acuosa, pero se da en emulsiones que contienen lípidos como aceites esenciales o triacilglicéridos de cadena corta.

I.5.1.2. Propiedades espumantes

Las espumas son sistemas de dos fases que consisten en burbujas de gas dispersas a través de una fase continua, la cual puede ser sólida o líquida. Similar a las emulsiones, las espumas son sistemas termodinámicamente inestables debido a una larga superficie interfacial aire/agua (Ec. 2), por ello son necesarios agentes surfactantes que posean una rápida capacidad de difusión hacia la interfase y, de esta manera, descender la tensión interfacial y retardar el colapso de las burbujas de gas. Los surfactantes pueden clasificarse en dos categorías principales: surfactantes de bajo peso molecular (fosfolípidos, mono- y di-acilglicéridos, etc.) y surfactantes poliméricos (proteínas, polisacáridos).

Las burbujas de gas usualmente tienen diámetros mayores a 10 μm y suelen alcanzar los 1000 μm y, aunque la estabilidad de la espuma no es necesariamente función del tamaño de las burbujas, hay un tamaño óptimo para distintos tipos de espumas (Schramm, 2005). Dependiendo de la fracción de volumen de gas en las espumas, las burbujas pueden adoptar formas esféricas o poliédricas (Damodaran, 2005). Una espuma recientemente hecha se considera húmeda debido al gran contenido de agua que rodea a las burbujas, a medida que la espuma madura el líquido comienza a drenar y la espuma se vuelve seca dejando detrás burbujas poliédricas (Bergeron y Walstra, 2005). La transición de burbujas esféricas a poliédricas depende de la relación líquido/gas o fracción de volumen de gas (ϕ_g). No existe un valor de corte definido para distinguir si una espuma es seca o húmeda pero cuando $\phi_g \approx 0,63$ se trata de espuma muy húmeda (Ellis y Lazidis, 2018) y cuando $\phi_g > 0,74$ ya no es posible empaquetar la fase dispersa como esferas y es necesario cierta deformación (Hailing y Walstra, 1981), por lo que las burbujas se distorsionan en poliedros con caras planas, separadas por una delgada película de líquido. En la estructura que adopta la espuma seca (Fig. I.5) se encuentra una zona llamada lamela que se define como la región que abarca la delgada película de líquido, las interfases que se encuentran a cada lado de la película, que separan el gas del líquido, y parte de la conjunción con otra lamela. Las burbujas se ordenan de manera tal que se forma un ángulo de 120 °, y el borde donde se reúnen se denomina borde de *Plateau* (Schramm, 2005).

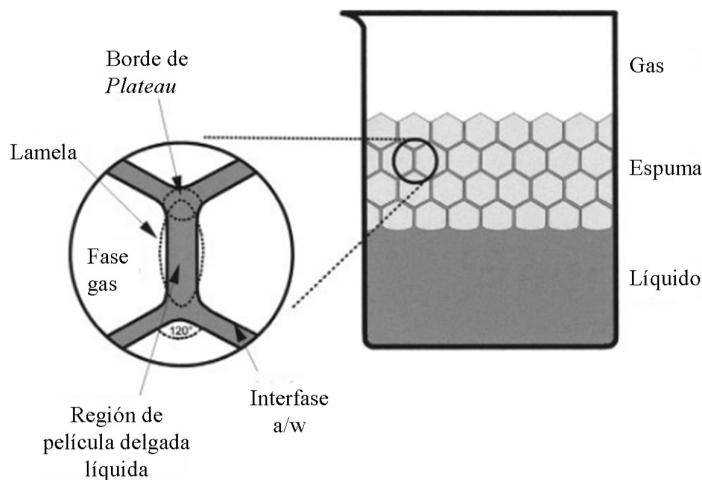


Figura I.5: Ilustración general de una espuma seca. Fuente: Schramm (2005).

En la industria de alimentos, las propiedades espumantes de las proteínas son importantes para la obtención de helados, crema batida, pasteles, *mousses*, merengues, *soufflés*, pan. La incorporación de aire a los alimentos no solo reduce el costo y el contenido calórico, sino que otorga propiedades de textura deseables por los consumidores, además de modificar la apariencia, el color y las propiedades físicas de los productos (Ellis y Lazidis, 2018).

Formación de la espuma

Para obtener una espuma a partir de una solución o dispersión de proteínas, se realiza la incorporación de aire, CO₂ o N₂ a través de diferentes maneras:

- Sobresaturación de un líquido con gas por a) disolución de un gas bajo presión con su posterior liberación al descender la presión (ej.: cervezas, gaseosas), o b) formación de gas in-situ (ej.: fermentación de masas).
- Medios mecánicos como a) inyección de gas a través de un único orificio o de un vidrio fritado (burbujeo), o b) batido o agitación con cantidad ilimitada de gas.

Los métodos más utilizados en el laboratorio para el estudio de las propiedades espumantes de las proteínas son el método de batido y el de burbujeo. Entre las ventajas del método del batido encontramos su bajo costo y fácil manejo ya que se emplean homogeneizadores, así como batidoras convencionales, representando el proceso industrial; y entre las desventajas, encontramos el aumento de temperatura debido al trabajo mecánico, el uso de grandes cantidades de solución (50-250 mL) con concentraciones de proteína entre 0,5-10% y el requerimiento de la remoción de espuma una vez obtenida para el estudio de su estabilidad. Por otro lado, el método de burbujeo en

Capítulo I

una columna presenta las ventajas de que permite trabajar con pequeños volúmenes de solución (< 20 mL) y con bajas concentraciones de proteína (0,01-0,5%), tiene buena reproducibilidad debido a que el volumen y caudal de aire son controlables y el volumen de las burbujas resulta más homogéneo (Wagner, 2000).

Las propiedades espumantes se evalúan durante el proceso de formación de la espuma. La capacidad o actividad espumante se define como el volumen de espuma formado luego de un determinado tiempo de batido o introducción de gas (Kannan y col., 2012), aunque este parámetro está vinculado al método de obtención de la espuma (Wagner, 2000). En cualquier caso, dicho parámetro debe reflejar la habilidad de las proteínas para incorporar aire en una solución. Además del método de obtención, hay que definir el método de medición para evaluar la capacidad espumante de una proteína, y este puede ser por volumetría, conductimetría, medidas diferenciales de presión, microscopía, etc.

En este trabajo se seleccionó el método de burbujeo para la formación de espumas, utilizando el equipo desarrollado por Loisel y col. (1993), que permite evaluar el proceso de formación de espuma por medidas conductimétricas y seguir de forma simultánea la variación del volumen de la espuma mediante detección óptica. En este método, la capacidad espumante se obtiene por la relación entre la conductividad de la espuma y la del líquido.

Estabilidad de la espuma

A diferencia de la capacidad espumante, el concepto de estabilidad de la espuma es independiente del método de obtención empleado (Wagner, 2000). La estabilidad de la espuma está determinada por la tensión superficial y la viscosidad de la fase continua, y las propiedades de la película. Estos factores, a su vez, están directamente relacionados a los solutos presentes en la fase continua (proteínas, sales, etc.), a la distribución del tamaño de burbuja, a la temperatura, al movimiento y la naturaleza de la fase gaseosa (Wagner, 2000).

Una mayor concentración de proteína da firmeza a la espuma. Esta firmeza se logra con un tamaño menor de burbuja y una mayor viscosidad. Al aumentar la viscosidad se facilita la formación de multicapas cohesivas de la película de proteína en la interfase (Carrera-Sánchez y Rodríguez-Patino, 2005). La ALB sérica fácilmente forma espumas y las estabiliza a concentraciones de proteína tan bajas como 1%, en tanto que el aislado proteico de suero de leche y la conglicina de soja requieren un mínimo de 2 al 5 %. La mayoría de las proteínas presentan capacidad de espumado en un rango de concentración

del 2 al 8%. La concentración interfacial de las proteínas en la espuma es aproximadamente entre 2-3 mg/m².

Durante el proceso de desestabilización ocurre la aproximación y fusión de las burbujas a fin de alcanzar la mínima energía libre (tendencia de la fase gaseosa discontinua a formar una fase continua). Tan rápido como se forma la espuma, ocurren en simultáneo diferentes procesos que llevan a su desestabilización: drenado, desproporción y colapso.

Drenado

El drenado consiste en la desaparición del líquido que ocupa el espacio entre dos burbujas de aire y produce el estrechamiento de las películas líquidas que las separan. El líquido comienza a drenar desde la parte superior de la espuma, fluyendo desde la lamela al borde de *Plateau*, siguiendo la dirección de las fuerzas de gravedad (Fig. I.5). Este proceso es a su vez afectado por otros factores como la diferencia de densidad entre ambas fases y la viscosidad de la fase líquida. Al comienzo del drenado se produce una separación de las burbujas dentro de la espuma acorde a la ley de Stokes (Ec. 3), donde v_{stokes} corresponde a la velocidad de flotación de las burbujas. En concordancia con esta ley las burbujas grandes migran hacia la superficie más rápidamente que las pequeñas dado el menor radio, menor relación superficie/volumen y menor resistencia. A su vez el líquido drena por efecto de la gravedad y por la diferencia de presión entre la lamela y el borde de *Plateau* que impulsa el pasaje de líquido hacia este último. Este gradiente de presión se debe a la diferencia de curvatura entre la lamela y el borde de *Plateau* de acuerdo con la ley de Laplace

$$\Delta P \propto \gamma \left[\left(\frac{1}{R_a} \right) - \left(\frac{1}{R_b} \right) \right] \quad (\text{Ec. 4})$$

donde ΔP es la diferencia de presión, γ la tensión superficial, R_a el radio de curvatura del borde de *Plateau* y R_b el radio de curvatura de la lamela.

Desproporción y colapso

La desproporción, también llamada maduración de Ostwald, es el fenómeno por el cual se produce el crecimiento de las burbujas de gas a expensas de las más pequeñas. La fuerza impulsora para que ocurra este fenómeno es la diferencia de presión de Laplace a través de la superficie de la burbuja (que surge de la aplicación de la Ec. 4, con la diferencia que en este caso R_a es el radio de curvatura de la burbuja pequeña y R_b el radio de curvatura de la burbuja grande). Además, esto conduce a que las burbujas asuman una forma poliédrica por compresión de unas contra otras.

Capítulo I

El colapso (disminución del volumen de las espumas) está dado por la ruptura de la lamela, que se debilita por disminución de su espesor (por drenado o evaporación del líquido), o por presencia de partículas.

En las espumas recién formadas y diluidas, predomina el drenado, mientras que en espumas con burbujas poliédricas predominan la desproporción y el colapso (Hailing y Walstra, 1981).

I.5.2. Gelificación

La gelificación puede ser definida como un fenómeno de agregación ordenada en el cual fuerzas atractivas y repulsivas están balanceadas de modo de obtener una matriz o red proteica capaz de retener una gran cantidad de agua (Hermansson, 1979). En los sistemas alimentarios tales como los productos lácteos, como quesos y yogures, los embutidos, masas de panificación y proteínas vegetales texturizadas por extrusión, la capacidad de agregación y gelificación son determinantes. La gelificación no solo se utiliza para formar sólidos viscoelásticos, sino también para mejorar la absorción de agua, los efectos espesantes, fijación de partículas (adhesión) y para mejorar la estabilidad de espumas y emulsiones (Fennema, 1996).

Las fuerzas de atracción incluyen interacciones hidrofóbicas (potenciadas por las temperaturas elevadas), electrostáticas, puente hidrógeno (potenciados por el enfriamiento) e interacciones covalentes (puentes disulfuro). Las fuerzas de repulsión que actúan principalmente a pH alejados del pI y las interacciones proteína-agua, ayudan a mantener las cadenas polipeptídicas separadas favoreciendo la formación de una matriz homogénea (Heertje, 1993). La contribución de cada tipo de unión depende de la naturaleza de las proteínas, así como del pH y de la fuerza iónica del medio (Utsumi y Kinsella, 1985 a y b; Damodaran, 1988; Puppo y col., 1995). El aumento de la concentración proteica facilita la interacción intermolecular y la gelificación. A concentraciones proteicas altas, la gelificación puede tener lugar incluso en condiciones ambientales que no sean especialmente favorables para la agregación (sin calentamiento, a valores de pH alejados del pI, etc.).

Formación de geles

Una solución proteica puede transformarse en gel por medio de mecanismos físicos y químicos. Los agentes físicos pueden ser energía térmica o altas presiones, mientras que los agentes químicos que se pueden incorporar para inducir la gelificación pueden ser iones como el calcio, sales, enzimas, entre otros (Totosaus y col., 2002). La mayoría de los geles

de proteínas se preparan calentando la solución de proteína, lo que induce una desnaturización que puede ser considerada un estado “progel”, es un líquido viscoso en el que ocurren algunos eventos de polimerización de la proteína. Ésta se despliega y se exponen numerosos grupos funcionales, como los grupos hidrofóbicos, y las moléculas de proteína interaccionan entre sí. Luego de un cierto tiempo se llega al “punto gel” donde la interacción entre agregados es suficientemente importante como para generar una matriz primaria que exhibe propiedades de sólido viscoelástico. Estas propiedades pueden ir cambiando con el tiempo y con el enfriamiento hasta formar la matriz de equilibrio, es decir, la estructura final del gel (Pilosof, 2000b). Cuando el progel se enfriá, a temperatura ambiente o de refrigeración, baja la energía cinética y esto facilita la formación de uniones estables no covalentes gracias a la exposición de grupos funcionales de varias moléculas, lo que constituye la gelificación.

Es posible también gelificar proteínas en frío en un solo paso aplicando altas presiones hidrostáticas, generalmente se requieren concentraciones proteicas mayores a las necesarias para gelificar con tratamiento térmico y dependen del nivel de presión aplicado. Los cationes divalentes, como Ca^{2+} , también pueden inducir la formación de geles proteicos o bien modificar el proceso de gelificación de las proteínas. Estos iones forman enlaces cruzados entre grupos negativamente cargados de las moléculas de proteína (Damodaran, 2010).

Las interacciones involucradas en la formación de la red son principalmente puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas y electroestáticas, cuya contribución varía con el tipo de proteína, condiciones de calentamiento, el grado de desnaturización y las condiciones ambientales. Los geles que se forman sustancialmente por interacciones no covalentes (principalmente por puentes de hidrógeno) son térmicamente reversibles y cuando se calientan de nuevo se funden en un estado de progel, como se observa comúnmente con los geles de gelatina. Los geles formados principalmente por interacciones hidrofóbicas son resistentes a elevadas temperaturas y son irreversibles como los geles de clara de huevo. Las proteínas que contienen restos de cisteína y cistinas polimerizan vía interacciones puente disulfuro y también son térmicamente irreversibles (Nemati y col., 2004; Meng y col., 2002; Molina Ortiz y Wagner, 2002).

Cuando las proteínas se asocian entre ellas, el líquido viscoso se transforma en una matriz viscoelástica. Sin embargo, debido a que los geles pueden presentar un comportamiento *soft* por el cual se rompen y fluyen bajo la aplicación de fuerzas muy pequeñas, una definición estricta es muy difícil y por lo que se utilizan los términos fuerte

Capítulo I

o débil para una subclasificación de los geles (Clark y Ross-Murphy, 1987; Pilosof, 2000b).

Desde el punto de vista microestructural, las proteínas pueden formar dos tipos de geles principalmente: geles opacos o particulados, y geles translúcidos. El tipo de gel que se forme está determinado por las propiedades moleculares de la proteína y sus condiciones durante la formación del gel. Las proteínas con grandes cantidades de aminoácidos no polares se agregan al desnaturizarse, formando agregados insolubles que se asocian al azar formando geles tipo coágulo, irreversibles. Estas proteínas van formando el gel aun cuando se está calentando la solución, porque la velocidad de agregación y formación de red es mayor que la de desnaturización. La red que se obtiene es desordenada y dispersa la luz, lo que da una apariencia opaca. Por el contrario, las proteínas con cantidades pequeñas de aminoácidos no polares forman complejos solubles al desnaturizarse. La velocidad de asociación de estos complejos solubles facilita la asociación ordenada de moléculas de proteína y el grosor de los filamentos es muy pequeño de tal forma que estos geles son transparentes. Los filamentos finos tienen un grosor unas pocas veces el tamaño de una molécula de proteína. Los geles agregados o particulados están compuestos por partículas con diámetros en el rango de 100-1000 veces una molécula de proteína. También se forman geles que contienen estructuras intermedias que contienen filamentos finos y gruesos simultáneamente (Hermansson, 1994). En general, los filamentos de los geles se vuelven más gruesos a medida que el pH se acerca al pI de las proteínas o cuando aumenta la fuerza iónica del medio (Renkema, 2004).

La textura y la fuerza de los geles proteicos dependen de factores intrínsecos como la composición y concentración de proteínas y factores extrínsecos como la temperatura de calentamiento, el pH, la fuerza iónica, etc. (Damodaran, 1989). Un mejor entendimiento de estos factores permitirá ajustar y controlar el proceso de gelificación de un determinado sistema (Zhou, 2015).

I.6. Efecto del pH y fuerza iónica

El pH juega un rol importante en la determinación de las propiedades fisico-químicas, microbiológicas y organolépticas de los productos alimenticios. En emulsiones, por ejemplo, el pH está en el rango de 2,5 (emulsiones presentes en bebidas sin alcohol de frutas y hortalizas) a 7,5 (formulaciones para niños) (Giraudo y col., 2011). El pH puede ajustarse mediante ácidos orgánicos o inorgánicos, agregando bacterias (estreptococos o lactobacilos) o bien estabilizado a un cierto valor utilizando sistemas *buffers*, por ejemplo,

ácido cítrico/citrato (pH 2,1-4,7), ácido acético/acetato (3,6-5,6), ácido fosfórico y fosfatos (2-3; 5,5-7,5; 10-12) (Giraudo y col., 2011).

El pH del medio afecta la estabilidad de las emulsiones que tiene gotas de aceite recubiertas por proteínas vegetales. Las proteínas vegetales son proteínas globulares que forman films interfaciales relativamente delgados. A pH suficientemente alejados del pI, las emulsiones son estables a la floculación porque tiene una elevada carga positiva o negativa, mientras que a pH cercanos al pI, las gotas son más susceptibles a la floculación y al cremado debido a su baja carga eléctrica. Sin embargo, las gotas pueden ser relativamente estables a la coalescencia debido a la fuerte repulsión estérica asociada a la capa interfacial. El tipo de sensibilidad al pH se observó para una amplia gama de proteínas de calidad alimentaria y es uno de los inconvenientes para determinadas aplicaciones alimentarias (McClements y col., 2017).

En el caso de las espumas, diversos estudios han mostrado que las proteínas que las estabilizan presentan mejores propiedades cuando el pH=pI más que en cualquier otro pH, si no hay insolubilización (Yu y Damodaran, 1991). En el pI o cerca de éste, la reducida presencia de interacciones de repulsión promueve interacciones proteína-proteína y la formación de una película viscoelástica en la interfase, lo que favorece tanto la capacidad de espumado como la estabilidad de la espuma. Si la proteína es poco soluble en su pI, como la mayoría de las proteínas en alimentos lo son, entonces sólo la fracción soluble de la proteína se verá involucrada en la formación de la espuma, y aunque la cantidad de espuma formada sea baja la estabilidad será alta. Aunque la fracción insoluble no contribuye a la capacidad de espumado, la adsorción de las partículas de proteína insoluble puede estabilizar la espuma, probablemente por un aumento en las fuerzas de cohesión en la película de proteína (Badui Dergal, 2013).

El pH es crucial para el proceso de gelificación y para las características de los geles obtenidos debido a su efecto en la carga neta de las proteínas y las interacciones intermoleculares (Puppo y col., 1995). A pH cercano al pI de las proteínas, predominan las interacciones hidrofóbicas y resultan en la formación de geles por entrecruzamientos proteína-proteína (Lawal, 2004). Además, en estas condiciones de pH y cuando la temperatura es baja se puede llegar a reducir la concentración crítica de proteínas para la formación de gel. Esto se debe a que una menor repulsión entre las proteínas permite la interacción de una mayor proporción de éstas para constituir la red tridimensional (Al-Ali y col., 2021). En cuanto a las características de los geles, cerca del pI de las proteínas, se promueve la formación de geles con hebras gruesas, compuestos por agregados

Capítulo I

particulados. A pH alejados del pI, se obtienen geles de hebras finas y apariencia transparente (Munialo y col., 2015).

La fuerza iónica en la mayoría de los productos de la industria alimentaria varía de 0,02 a 0,20 (10-100 mM NaCl) (Ruiz-Henestrosa y col., 2007) aunque algunos estudios han demostrado que la solubilidad de las proteínas puede mejorar cuando la fuerza iónica es cercana a 0,54 (400 mM NaCl) (Taha, 2019). El NaCl es comúnmente utilizado en la industria de alimentos para aumentar el sabor, preservar los alimentos y mejorar el procesamiento, pero además es un fuerte modulador de la funcionalidad de las proteínas (Piornos y col., 2015). Cuando se añaden sales a una solución de proteínas, se producen interacciones electrostáticas entre las sales y los residuos de aminoácidos cargados, estabilizando el plegamiento original de la molécula cuando se encuentran en bajas concentraciones. Cuando se trata de concentraciones más altas ($> 1 \text{ M}$), los iones logran estructurar en mayor o en menor grado a las moléculas de agua alrededor de la proteína (agua “*bulk*”), causando una interacción indirecta con la proteína. Cuando las sales promueven la formación de puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua, las proteínas conservan su estructura nativa. En cambio, si las sales rompen la estructura del agua “*bulk*” desnaturalizan las proteínas ya que desestabilizan las interacciones hidrofóbicas intramoleculares, quedando expuestos los sitios hidrofóbicos al medio acuoso.

La magnitud y el rango de la repulsión electrostática entre dos gotas de emulsión decrece a medida que aumenta la fuerza iónica de la solución debido al apantallamiento electrostático por acumulación de contraiones alrededor de la superficie de las gotas. El apantallamiento electrostático se vuelve más pronunciado a medida que la concentración y la valencia de los contraiones aumenta en la solución que rodea a las gotas de emulsión. Esto tiene importantes consecuencias en la textura, estabilidad y apariencia de las emulsiones alimentarias y explica la susceptibilidad de las emulsiones estabilizadas electrostáticamente a la floculación cuando la concentración de electrolitos aumenta por encima de un nivel crítico (McClements, 2016).

El efecto de las sales sobre las propiedades espumantes de las proteínas depende del tipo de sal y las características de solubilidad de la proteína en esa solución salina. La capacidad de espumado y la estabilidad de la espuma de la mayoría de las proteínas globulares, como albúmina sérica bovina, albúmina de huevo, gluten y proteínas de soja, aumentan conforme se incrementa la concentración de NaCl. Este comportamiento se atribuye generalmente a la neutralización de las cargas por los iones salinos. Sin embargo, algunas proteínas, como las del suero, presentan el efecto opuesto. Tanto la capacidad de

espumado como la estabilidad de la espuma disminuyen conforme se incrementa la concentración de la sal por efecto *salting-in*.

A baja fuerza iónica las sales afectan principalmente las interacciones electrostáticas por interacción con los grupos cargados de proteínas, mientras que a altas concentraciones predomina el efecto específico de cada ión (efecto liotrópico). Sales como NaSCN tienen un efecto desestabilizante mientras sales como el NaCl tienen un efecto estabilizante, llegando incluso a inhibir la desnaturización de las proteínas (Damodaran y Kinsella, 1981). La desnaturización proteica es un prerrequisito para la formación de geles, por lo que en algunos casos altas concentraciones de NaCl (2 M) pueden suprimir la gelificación de las proteínas (Sun y Arntfield, 2011). En geles proteicos de soja se ha informado que a baja fuerza iónica ($\mu \approx 0,1-0,25$) se forman geles de estructura más cerrada, de mayor dureza y menor elasticidad, mientras que cuando $\mu > 0,5$ los geles tienen una estructura más abierta, de baja dureza y mayor elasticidad (Puppo, 1997).

I.7. Hipótesis de trabajo

Dadas las características de las harinas de *Cajanus cajan*, es esperable obtener fracciones y aislados proteicos, éstos últimos con propiedades tecnofuncionales específicas que los hagan adecuados para ser utilizados como ingredientes en la formulación de alimentos bajo distintas condiciones de pH o fuerza iónica.

Capítulo II

Objetivos

II.1. General

- Estudiar desde el punto de vista estructural y tecnofuncional las proteínas de *Cajanus cajan* a efectos de obtener conocimientos que puedan conducir a potenciales aplicaciones en la industria alimentaria.

II.2. Específicos

- Aislar y caracterizar las fracciones mayoritarias y aislados proteicos de *Cajanus cajan* desde el punto de vista fisicoquímico-estructural.
- Determinar las propiedades tecnofuncionales de aislados proteicos de *Cajanus cajan* y analizar las relaciones existentes entre dichas propiedades y las características estructurales que exhiben las proteínas.
- Analizar la influencia del pH y fuerza iónica sobre las propiedades de superficie y de interacción proteína-proteína en aislados proteicos de *Cajanus cajan*.

Capítulo III

Materiales y Métodos

III.1. Material Vegetal

Las semillas de *Cajanus cajan* L. fueron provistas por la Estación Experimental El Sombrero-Corrientes (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-INTA). Se trabajó con semillas ubicadas en parcelas individuales de 7 x 5 m (35 m²). Las parcelas se instalaron sobre suelos de la Estación Experimental pertenecientes a la Serie Treviño, clasificado como Argiudol acuértico. La siembra se realizó manualmente, en líneas distanciadas a 70 cm, sin fertilización de base ni de cobertura. El momento de siembra fue al inicio de la primavera. Los controles de malezas se realizaron según ocurrencia, al igual que el manejo de plagas y enfermedades. La operación de cosecha y trilla se realizó en forma manual, de acuerdo con las prácticas habituales de los agricultores. La conservación de las semillas cosechadas se realizó en recipientes herméticos y una vez llegado al laboratorio se almacenaron a 10 °C hasta su uso, luego de separar las semillas dañadas.

III.1.1. Harinas

Las semillas de CC fueron molidas en un molinillo eléctrico (Smart-tek model, coffee grinder, China) y luego tamizadas con un tamiz con aberturas de 177 µm (ASTM 80). Posteriormente, la harina se desgrasó con hexano (relación hexano: harina, 10:1 volumen/masa), agitando la dispersión durante 24 h a 4 °C, para luego eliminar el exceso de hexano por filtración y posterior evaporación a temperatura ambiente. La harina de CC se conservó en recipientes herméticamente cerrados a 10 °C hasta su uso.

III.1.2. Obtención de fracciones proteicas mayoritarias

La extracción secuencial de las fracciones ALB y GLB se realizó de acuerdo a la diferencia de solubilidad en diferentes solventes, según Rosa y col. (2000), con algunas modificaciones. La relación solvente:harina empleada en la extracción fue 34 mL/g. Para la fracción ALB se utilizó como solvente de extracción agua destilada, conteniendo 10 mM CaCl₂ y 10 mM MgCl₂ (pH 8,0). La suspensión se mantuvo con agitación durante 4 h a 4 °C y luego se centrifugó a 10.000 x g durante 30 min. El sobrenadante se liofilizó (fracción ALB) y fue almacenado a -20 °C hasta su uso; el residuo se resuspendió en un *buffer* (100mM Tris-HCl, 10 % p/v NaCl, 10 mM EDTA y 10 mM EGTA) (pH 7,5). La suspensión se mantuvo con agitación durante 3 horas a 4 °C y luego se centrifugó a 10.000 x g durante 30 min. La fracción GLB contenida en el sobrenadante fue precipitada por adición de sulfato de amonio (561 g/L), y centrifugado (10.000 x g, 20 min). El *pellet* fue resuspendido *buffer* Tris-HCl 50 mM (pH 7,5). El desalado de la fracción GLB se realizó mediante diálisis con membranas de celulosa (Sigma-Aldrich) a 4 °C en agua destilada

Capítulo III

durante 72 h, con recambios sucesivos de agua destilada dos veces en el día. Las membranas de diálisis se activaron en agua destilada hirviendo durante 10 min previo a su utilización. El producto de la diálisis fue liofilizado (fracción GLB) y almacenado a -20 °C hasta su uso.

III.1.3. Obtención de aislados proteicos

Los aislados proteicos se obtuvieron según el método de Horax y col. (2004). Se prepararon dispersiones al 10% p/v de harina desgrasada en agua destilada y se llevaron al pH de extracción (8,0; 9,0; 10,0 y 11,0) con NaOH 2 N. Las dispersiones se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 10.000 x g por 30 min a 20 °C (Sorvall, ST 8R, Thermo Scientific, Alemania). Los sobrenadantes se ajustaron a pH 4,5 con HCl 2 N, se agitaron por 2 h a 4 °C y luego se centrifugaron a 10.000 x g por 20 min a 4 °C. El *pellet* se resuspendió en agua destilada y se llevó a pH 7,0 con NaOH 2 N, luego se liofilizó y almacenó a 4 °C hasta su uso. Los aislados obtenidos se llamaron A8, A9, A10 y A11, según el pH de extracción proteica.

III.1.4. Rendimiento en peso y de proteínas totales

Se calculó el rendimiento en peso de la extracción de las fracciones ALB y GLB y de los aislados proteicos, como el porcentaje en peso de la muestra obtenida en relación con el peso de harina inicial. Además, se calculó el porcentaje del rendimiento de extracción de proteínas totales, a partir del contenido total de proteínas en la harina y en las muestras.

$$\text{Rendimiento en peso (\%)} = \frac{\text{peso de muestra}}{\text{peso de harina}} \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

$$\text{Rendimiento de proteína (\%)} = \frac{\text{contenido proteico de muestra}}{\text{contenido proteico de harina}} \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde muestra: ALB, GLB, A8, A9, A10 y A11.

III.2. Composición química

La composición química de las muestras fue determinada mediante técnicas recomendadas por la AOAC, Official Methods of Analysis (1990) las cuales se detallan a continuación:

III.2.1. Contenido de proteínas bruta

El contenido de proteínas de la harina, fracciones proteicas mayoritarias y aislados proteicos se determinó mediante microKjeldahl (960.52, AOAC, 1990). El factor de conversión utilizado fue 6,25 g de proteína/g de nitrógeno.

III.2.2. Humedad

La humedad de aislados proteicos se determinó por diferencia de pesada (925.10, AOAC, 1990), colocando 1 g (+/- 0,0001 g) de muestra en placas de Petri, luego se llevó a estufa (Dalvo, Argentina) a 105 °C hasta peso constante, dejando enfriar las placas de Petri en desecador.

III.2.3. Cenizas

El contenido de cenizas totales de aislados proteicos se evaluó colocando 1 g (+/- 0,0001 g) de muestra en cápsulas de porcelana y se carbonizó con mechero hasta la desaparición de humos blancos, luego se calcinó en la mufla durante 3 horas a 550 °C y posteriormente se pesó, dejando enfriar previamente la cápsula en desecador (923.03, AOAC, 1990).

III.3. Caracterización físico-química y estructural de fracciones y aislados proteicos

III.3.1. Electroforesis

III.3.1.1. Electroforesis monodimensional (SDS-PAGE)

Se realizaron las electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) de fracciones ALB, GLB y aislados proteicos, según lo descripto por Laemmli (1970). En esta metodología, las proteínas son puestas en contacto con el tensioactivo dodecilsulfato de sodio (SDS), formando complejos desnaturalizados con carga negativa. Dado que estos complejos proteína/SDS presentan similar relación carga/masa, la separación en gel queda determinada fundamentalmente por las diferencias en el peso molecular de los polipéptidos, con menor movilidad para los polipéptidos de mayor peso molecular, y viceversa.

Los geles de poliacrilamida estaban formados por un gel separador (acrilamida-bisacrilamida 12,0% p/v en *buffer* de gel separador, pH 8,8) y un gel concentrador (acrilamida-bisacrilamida 4,0% p/v en *buffer* de gel concentrador, pH 6,8). Las muestras liofilizadas se dispersaron en *buffer* de muestra (1 mg de proteína/mL) (pH 6,8). Además, se realizó la corrida electroforética en condiciones reductoras para lo cual se agregó 2-mercaptoetanol (2-ME) 5% v/v al *buffer* de muestra y se calentó un min en baño a ebullición. Las corridas se realizaron con *buffer* de corrida (pH 8,3) a una corriente constante de 25 mA por gel durante aproximadamente 45min (Miniprotean Tetra Cell, BIO-RAD). Se utilizaron patrones de bajo peso molecular: β -fosforilasa (94 kDa),

Capítulo III

albúmina de suero bovino (67 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa), β -lactoalbúmina (14,4 kDa) (LWM - Pharmacia). Los geles obtenidos por las técnicas de electroforesis fueron fijados y coloreados con Coomassie Brillant Blue R-250 al 0,1% en agua:metanol:ácido acético (10:10:4) (v/v/v) durante 2 horas, y decolorados con una solución de agua:etanol:ácido acético (13:5:2) (v/v/v). Luego, los geles fueron fotografiados y las imágenes analizadas con software (ImageJ, V1.51j8). Cuando fuera necesario, se realizó una tinción con nitrato plata para aumentar la sensibilidad (Blum y col., 1987).

III.3.1.2. Electroforesis bidimensional (IEF/SDS-PAGE)

Las fracciones ALB y GLB y el aislado A8 fueron analizados mediante electroforesis en dos dimensiones (IEF/SDS-PAGE). La cantidad de proteína sembrada en la primera dimensión fue de 200 μ g. La separación por punto isoeléctrico de las proteínas se llevó a cabo utilizando *strips* (“tiras”) de 18 cm de longitud de rango de pH 3-10 (Inmobiline Dry Strips pH 3-10, 18 cm; Amersham Biosciences). Las tiras fueron hidratadas durante 14 h a temperatura ambiente, con un buffer contenido urea 7 M, 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propansulfonato (CHAPS) 2% p/v, tiourea 2 M, ditiotreitol (DTT) 28% p/v, 10 μ l buffer IPG 3-10 (Amersham Biosciences) y cubiertas con 3 mL de aceite mineral (Amersham Biosciences) para evitar su deshidratación. La separación de los polipéptidos por su punto isoeléctrico (pI), se llevó a cabo a temperatura ambiente en un equipo Ettan IPGphor System (Amersham Biosciences) utilizando la siguiente secuencia de potenciales: 1 h a 500V, 1 h a 1000V y 4 h a 8000V hasta alcanzar al final de la corrida 30.000 V/ h. Una vez finalizada la corrida y antes de realizar la segunda dimensión las tiras fueron equilibradas 1 h a 25 °C en cada una de las siguientes soluciones:

- Urea 6 M, glicerol 30% v/v, SDS 2% p/v, Tris-HCl 50 mM pH 8,8, azul de bromofenol 0,01% p/v y ditiotreitol (DTT) 30 mM.
- La segunda solución tiene la misma composición que la anterior a excepción del DTT que es reemplazado por iodoacetamida (IAA) 60 mM.

Para la segunda dimensión, se prepararon geles de poliacrilamida de 1 mm de espesor formados por un gel separador de concentración de acrilamida 12,5% p/v sin gel apilador. El *buffer* de corrida (1X) contenía Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% p/v. Las corridas electroforéticas se realizaron a una potencia de 1 W/gel durante 16 horas y se utilizaron dos *buffers* de corrida, uno para el cátodo (2X) y otro para el ánodo (1X). Se

utilizó un baño para recircular el *buffer* y evitar que suba la temperatura (máximo 30 °C). Los geles fueron fijados y teñidos al mismo tiempo con Coomasie Brilliant Blue R-250, y decolorados con una solución de agua:etanol:ácido acético (ítem III.3.1.1). Las imágenes de los geles fueron obtenidas mediante un scanner HP Scanjet G2710 y analizadas con software (ImageJ, V1.51j8).

III.3.2. Estabilidad térmica

El estudio de la estabilidad térmica de las proteínas se realizó mediante Calorimetría Diferencial de Barrido o DSC (*Differential Scanning Calorimetry*). La misma se basa en el análisis del proceso de desnaturalización o despliegamiento de las proteínas inducido térmicamente. Para ello la muestra y un material de referencia inerte, son sometidos a un programa de temperatura controlada, midiéndose la diferencia de energía entregada a la muestra y a la referencia en función de la temperatura y/o el tiempo. Cualquier cambio térmico inducido es detectado como un flujo diferencial de calor y registrado como un pico en el termograma. La transición de una proteína desde una conformación nativa a una desnaturalizada está acompañada por la ruptura de enlaces intra e intermoleculares. El análisis de un termograma de DSC permite la determinación de dos parámetros importantes: la temperatura de desnaturalización (T_d , °C) y la entalpía de desnaturalización (ΔH , J/g de proteína).

Las medidas de DSC se realizaron en un calorímetro TA Q100 (TA Instruments Inc., EE. UU.). Se prepararon dispersiones acuosas de ALB, GLB y aislados proteicos (20,0% p/p) en cápsulas de aluminio que fueron herméticamente selladas (10-15 mg de dispersión). Las cápsulas fueron calentadas desde 20 a 120°C a una velocidad de 5 °C/min. Las temperaturas de desnaturalización, T_d (°C), y la entalpía de transición, ΔH (J/g de proteína), se obtuvieron mediante el análisis de los termogramas con el software Universal Analysis 2000 (TA Instruments Inc., EE. UU.). La T_d fue la temperatura del máximo de la transición endotérmica, y el ΔH se calculó como el área correspondiente a la transición endotérmica. Dicha área se obtuvo trazando una línea de base recta uniendo el comienzo y la finalización de la transición térmica e integrando el flujo de calor en función del tiempo.

III.3.3. Cromatografía rápida de proteínas en medio líquido (FPLC)

III.3.3.1. Cromatografía de exclusión molecular (CEM)

La cromatografía es un método de separación muy utilizado, que permite la separación de los componentes químicos de mezclas complejas. En el caso de la cromatografía de exclusión molecular (CEM) el fraccionamiento se basa en el tamaño

Capítulo III

molecular. Las columnas de separación están formadas por pequeñas partículas de sílice o polímeros que contienen una red de poros, donde pueden difundirse las moléculas. Mientras están en los poros, las moléculas están atrapadas de manera efectiva y son eliminadas del flujo de la fase móvil. El tiempo de residencia medio de las moléculas del analito depende de su tamaño efectivo. Una de las aplicaciones de este método es la determinación rápida de la distribución de la masa molecular de polímeros grandes, para lo cual se realizan curvas de calibración a partir de patrones de masa molecular conocida.

En este trabajo la columna de exclusión molecular utilizada fue Superosa 6 10/300 GL (límite de exclusión: 4×10^7 , rango de separación: 5×10^3 y 5×10^6 Da) (GE Healthcare), la cual se calibró con azul dextrano (para el volumen muerto, V_0), y las siguientes proteínas de masa molecular conocida: tiroglobulina (669 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa), albúmina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa) y ribonucleasa (13,7 kDa). Se obtuvo una curva de calibración relacionando el logaritmo de la masa molecular (en kDa) con el K_{AV} , siendo K_{AV} :

$$K_{AV} = (V_e - V_0)/(V_T - V_0) \quad (\text{Ec. 3})$$

donde V_e corresponde al volumen de elución en mililitros del pico de interés, V_T corresponde al volumen total de la columna (24 mL) y V_0 al volumen muerto de la columna.

Las fracciones proteicas ALB y GLB, así como los aislados proteicos se dispersaron en *buffer* A (20 mg de proteína/mL) (Na_2HPO_4 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 8,0), durante 1 h a temperatura ambiente, y luego se centrifugaron (14.000 x g, 15 min, 20 °C). El sobrenadante fue filtrado a través de filtros de nylon de 0,45 μm de poro y el filtrado así obtenido se inyectó (0,2 mL) en el equipo de FPLC (AKTA purifier UPC10 GE Healthcare, Suecia). Todos los *buffers* utilizados fueron previamente filtrados a través de filtros de nylon con diámetros de poro de 0,22 μm . Las corridas se desarrollaron en el mismo *buffer* en que se solubilizó la muestra. La velocidad de flujo seleccionada fue de 0,2 mL/min y la presión promedio de las cromatografías fue de 0,3 MPa. Las cromatografías se realizaron a temperatura ambiente. Se realizó una colección automática de las fracciones eluídas (0,5 mL) y el perfil de elución se obtuvo a 214 nm. Los picos se agruparon y las proteínas fueron precipitadas con una solución de ácido tricloroacético 12,5% p/v. El precipitado se obtuvo por centrifugación (10.000 x g, 20 min, 25 °C), y se lavó con acetona, la cual se eliminó por centrifugación y el exceso por evaporación a temperatura ambiente. Se realizó la electroforesis de los picos mediante SDS-PAGE (ítem III.3.1.1).

III.3.3.2. Cromatografía de intercambio iónico (CII)

La cromatografía de intercambio iónico (CII) permite la separación de moléculas basadas en sus propiedades de carga eléctrica. En este caso, la fase estacionaria es un intercambiador de iones que lleva en su superficie cargas electrostáticas fijas, a las cuales se van a unir de forma reversible moléculas con carga opuesta. La separación mediante intercambiadores se realiza en dos fases: en la primera las moléculas a separar se unen al intercambiador utilizando condiciones que originan una unión fuerte y estable; a continuación, se eluye de la columna con *buffers* de diferentes pH o diferente fuerza iónica, lográndose una competencia entre los componentes del *buffer* con las moléculas por los sitios de unión.

Las fracciones proteicas ALB y GLB, así como los aislados proteicos fueron dispersados (10 mg de proteína/mL) en el *buffer* inicial de la cromatografía (*buffer* B: Tris HCl 0,02 M, pH 8,0) 1 h a temperatura ambiente, y se centrifugaron (14.000 x g, 15 min, 20 °C). El sobrenadante luego fue filtrado a través de filtros de nylon de 0,45 µm de poro. El *buffer* de corrida (alto contenido salino) utilizado fue

Buffer B + NaCl 1 M: Tris HCl 0,02 M (pH 8,0), NaCl 1 M

Se empleó una columna Mono Q 5/50 GL (GE Healthcare), de intercambio aniónico. El caudal empleado fue 1,0 mL/min a una presión promedio de 1,5 MPa. Se colectaron fracciones de 1,0 ml y el perfil de elución se obtuvo a 214 nm. Para la elución se utilizó un gradiente lineal de NaCl entre 0,0 y 1,0 M. Las fracciones recolectadas se analizaron mediante electroforesis de SDS-PAGE (ítem III.3.1.1).

III.3.4. Espectroscopia infrarroja

La espectroscopía infrarroja mide la longitud de onda y la intensidad de absorción de la radiación infrarroja de una muestra. La información del espectro IR de grandes polímeros usualmente es interpretada en términos de las vibraciones de las unidades repetidas en su estructura (Kong y Yu, 2007). En el caso de polipéptidos y proteínas, el grupo de seis átomos que conforman la unión peptídica ($C_\alpha CO-NHC_\alpha$) genera 9 bandas de absorción IR características, denominadas amida A, B y I-VII. De todas ellas, las bandas amidas I y II generan la mayor parte de la información buscada. La banda amida I está centrada en 1650 cm^{-1} y se atribuye a la vibración (estiramiento) del enlace $-C=O$ acoplado al aleto del H. Si utilizamos como solvente agua deuterada D_2O , el 1H de la unión peptídica es reemplazado por el 2H proveniente del solvente. La banda amida I sufre un pequeño desplazamiento debido al cambio en la masa reducida del sistema. La banda

Capítulo III

amida II es debida a la vibración angular del enlace N-H (aleteo) y estiramiento del enlace N-C (Montich, 2013). La región espectral más sensible a la estructura secundaria de las proteínas es la banda amida I. Los espectros de las distintas estructuras definidas (α -hélice, hoja plegada β , giros β , estructura desordenada) son característicos y han sido bien descriptos, lo cual permite calcular para proteínas puras la contribución de las distintas estructuras secundarias a su conformación. En este trabajo se observaron diferencias relativas debido a que se trabajó con mezclas de proteínas.

Las fracciones proteicas ALB y GLB, así como los aislados proteicos (10 mg de proteína) fueron suspendidos en 100 μ L de D₂O y analizados mediante un espectrómetro ATR-FTIR Thermo Nicolet iS10 (Thermo Scientific, EE. UU.). Los espectros IR (4000-400 cm^{-1}) fueron registrados mediante 16 barridos con 4 cm^{-1} de resolución espectral. La región del espectro IR correspondiente a la banda amida I de proteína (1700-1600 cm^{-1}) fue deconvolucionada y ajustada al modelo Gausiano/Lorentziano. El ajuste de las curvas fue realizado con OMNIC 8.3 software (Thermo Fisher Scientific Inc.).

III.3.5. Fluorescencia intrínseca

La espectrometría de fluorescencia es un método espectroscópico ampliamente utilizado que consiste en la caracterización de los espectros de excitación y/o de emisión de fluoróforos, así como la interacción entre ellos o con el entorno en el que se encuentran. La fluorescencia intrínseca de las proteínas está dada principalmente por los residuos aromáticos de los aminoácidos triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe). En la práctica, generalmente se estudia la fluorescencia del triptófano, ya que la señal de fenilalanina es baja y la de tirosina se debilita por reacciones secundarias (Freifelder, 1976).

La fluorescencia intrínseca de las muestras se determinó con un espectrofluorímetro FluoroMate FS-2 (Scinco, Corea del Sur) a una longitud de onda de excitación de 290 nm (ranura de excitación de 5 nm) y una longitud de onda de emisión entre 300 - 400 nm (ranura de emisión de 5 nm) a una velocidad de barrido de 300 nm/min, utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Las fracciones proteicas ALB y GLB, así como los aislados proteicos fueron dispersados (5 mg proteína/mL) en el *buffer* A (25 °C, 1 h). Las dispersiones se centrifugaron (10.000 \times g, 25 °C, 30 min) y los sobrenadantes fueron analizados. La intensidad de fluorescencia emitida se normalizó con la cantidad de proteína, teniendo en cuenta la concentración proteica en el sobrenadante determinada con el método de Lowry (Lowry y col., 1951).

III.3.5.1. Desnaturalización con urea

Una forma de analizar y comparar la estabilidad conformacional de una proteína es evaluar su comportamiento frente a la acción de agentes desnaturalizantes. De este modo, se estudiaron los cambios que sufren las fracciones proteicas, ALB y GLB, cuando son sometidas a una desnaturalización parcial por agentes químicos como la urea. Los cambios conformacionales fueron registrados por espectroscopía de fluorescencia. En primera instancia, las fracciones ALB y GLB fueron sometidas a una desnaturalización progresiva con urea, para lo cual se prepararon soluciones a concentraciones crecientes de urea siguiendo el protocolo indicado en la Tabla III.1.

Tabla III.1: Protocolo de preparación de muestras desnaturalizadas con urea.

Nº muestra	[urea] M	mL urea (10,0M)	mL buffer	mL proteína
1	0,00	0,00	3,00	0,15
2	0,63	0,20	2,80	0,15
3	0,95	0,30	2,70	0,15
4	1,27	0,40	2,60	0,15
5	1,59	0,50	2,50	0,15
6	1,90	0,60	2,40	0,15
7	2,54	0,80	2,20	0,15
8	3,97	1,25	1,75	0,15
9	4,13	1,30	1,70	0,15
10	4,29	1,35	1,65	0,15
11	4,44	1,40	1,60	0,15
12	4,60	1,45	1,55	0,15
13	4,76	1,50	1,50	0,15
14	4,92	1,55	1,45	0,15
15	5,08	1,60	1,40	0,15
16	5,24	1,65	1,35	0,15
17	5,40	1,70	1,30	0,15
18	6,35	2,00	1,00	0,15
19	6,98	2,20	0,80	0,15
20	7,14	2,25	0,75	0,15
21	7,62	2,40	0,60	0,15
22	8,10	2,55	0,45	0,15
23	8,57	2,70	0,30	0,15
24	9,52	3,00	0,00	0,15

Las muestras fueron incubadas durante 3 h con el desnaturalizante y posteriormente se midió el espectro de fluorescencia en un espectrofluorímetro FluoroMate FS-2 (Scinco, Corea del Sur). Se utilizó como longitud de onda de excitación 290 nm y se obtuvo un

Capítulo III

espectro de emisión en el rango de 300 a 550 nm a una velocidad de barrido de 300 nm/min. Para cada concentración de urea en estudio se determinó la posición del máximo del espectro de fluorescencia ajustando una curva polinomial de grado 5 (que fue la que realizó el mejor ajuste de los datos experimentales). Posteriormente se graficó el valor de la longitud de onda de máxima emisión ($\lambda_{\text{máx}}$) en cada caso versus la concentración de urea en unidades de molaridad, obteniendo de este modo las curvas de desnaturación.

Los puntos experimentales de las curvas de desnaturación fueron ajustados con la siguiente ecuación:

$$y = [(y_N - y_D)/(1 + e^{(x-x_0)/dx})] + y_D \quad (\text{Ec. 4})$$

donde “y” es cualquier parámetro observable escogido para seguir el proceso de desnaturación, en nuestro caso la $\lambda_{\text{máx}}$ del espectro de fluorescencia de las fracciones proteicas e y_N , y_D representan los valores de “y” ($\lambda_{\text{máx}}$) característicos de los espectros de la proteína completamente nativa y completamente desnaturizada. El valor de x_0 es la concentración de urea cuando la muestra está un 50% desnaturizada, x es la concentración de urea en cada punto.

La concentración proteica fue determinada por Lowry (Lowry y col., 1951).

Determinación de la estabilidad conformacional (ΔG_{H_2O})

A partir de las curvas de desnaturación con urea puede estimarse el parámetro termodinámico ΔG_D (cambio de energía libre) para la Reacción 1

Reacción 1



El método clásico para el análisis de estas curvas asume un mecanismo de dos estados para la reacción anterior. Por lo tanto, en el equilibrio sólo está presente en concentraciones apreciables la proteína completamente nativa o completamente desnaturizada. En la Figura III.1 se ilustra a modo de ejemplo la desnaturación a través de un mecanismo de dos estados para una proteína genérica y los cálculos que se realizan a partir de esta aproximación para un punto en la región de transición entre el estado nativo y desnaturizado.

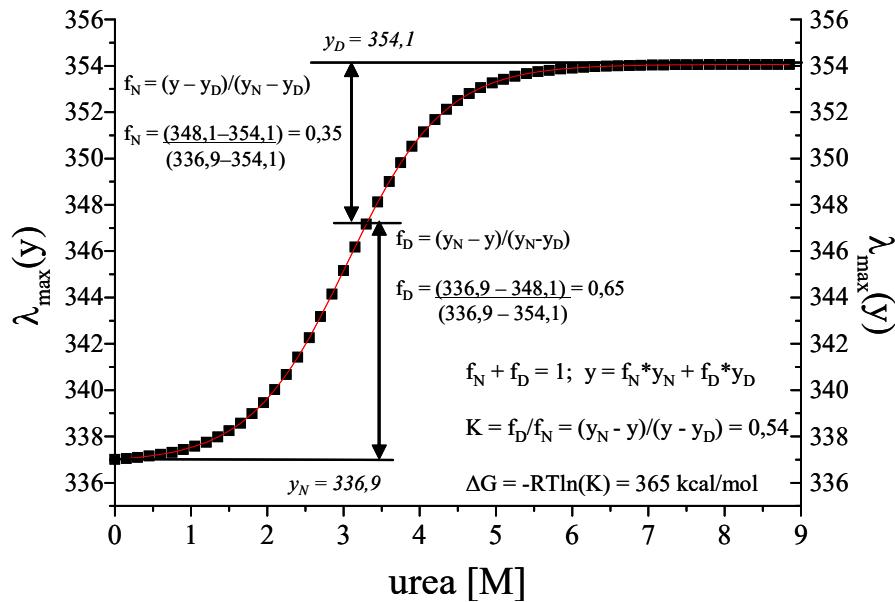


Figura III.1: Curva de desnaturalización con urea de una proteína genérica asumiendo un mecanismo de dos estados.

Por supuesto, estas consideraciones no son reales, ya que se está trabajando con muestras complejas y no con proteínas puras y, además, durante el pasaje desde el estado nativo al desnaturalizado forzosamente existen especies intermedias. Sin embargo, para muchas proteínas la concentración de las especies intermedias en el equilibrio son bajas en relación con la cantidad de proteína nativa y desnaturalizada. Despreciando la concentración de los intermediarios el análisis se hace más sencillo. Asumiendo entonces un mecanismo de dos estados se cumple que:

$$f_N + f_D = 1 \quad (\text{Ec. 5})$$

donde f_N y f_D representan la fracción de proteína total en la conformación plegada y desplegada respectivamente. El valor observado en cualquier punto de la curva de transición esta dado por:

$$y = y_N f_N + y_D f_D \quad (\text{Ec. 6})$$

donde “y” es cualquier parámetro observable escogido para seguir el proceso de desnaturalización, en nuestro caso la $\lambda_{\text{máx}}$ del espectro de fluorescencia de triptófano e y_N , y_D representan los valores de “y” ($\lambda_{\text{máx}}$) característicos de la proteína completamente nativa y completamente desnaturalizada. Los valores para f_N y f_D en cualquier punto de la región de transición se obtienen por la extrapolación de las líneas de base trazadas en las regiones antes y después de la transición. Si se combinan las ecuaciones 5 y 6 se obtiene:

$$f_D = (y_N - y) / (y_N - y_D) \quad (\text{Ec. 7})$$

Capítulo III

El valor de la constante de equilibrio (K_D) y del cambio de energía libre (ΔG_D) para la *Reacción 1* puede ser calculada usando:

$$K_D = f_D / (1 - f_D) = f_D / f_N = (y_N - y) / (y - y_D) \quad (\text{Ec. 8}) \quad \text{y}$$

$$G_D = -RT \ln K_D = -RT \ln [(y_N - y) / (y - y_D)] \quad (\text{Ec. 9})$$

donde R es la constante de los gases [1,987 kcal/(Kmol)] y T la temperatura expresada en grados Kelvin (K). La constante de equilibrio puede medirse con mayor precisión en el punto medio de la curva de desnaturalización, para valores de K_D por fuera del rango 0,1-10 ($0,1 \leq f_D \leq 0,9$) el error se vuelve importante.

Para obtener un valor aproximado de la estabilidad conformacional (ΔG_{H2O}) a partir de estas medidas, los valores obtenidos para la constante de equilibrio K_D se grafican en función de la concentración de desnaturalizante y se extrapola hasta una concentración igual a cero. Al analizar los datos de este modo, se encuentra generalmente un valor para ΔG_D que varía linealmente con la concentración empleada del agente desnaturalizante.

$$\Delta G_D = \Delta G_{H2O} - m[\text{urea } M] \quad (\text{Ec. 10})$$

III.3.6. Hidrofobicidad superficial

Esta determinación se fundamenta en la capacidad de unión de una sonda hidrofóbica fluorescente a los sitios hidrofóbicos de la proteína. La sonda utilizada en este trabajo de tesis fue 1-anilinonaftaleno-8 sulfonato (ANS) (Aldrich Chemical Co., EE. UU.), la cual es una sonda aniónica aromática. Cuando la sonda se une a un sitio aromático, fluórese con mayor intensidad y a una longitud de onda diferente a la correspondiente de la sonda libre.

La hidrofobicidad superficial (H_o) de las fracciones proteicas ALB y GLB, así como de aislados proteicos se determinó con el método de Cardamone y Puri (1992) en dispersiones de 0,1-0,3 mg proteína/mL en *buffer* A (ítem III.3.3.1), las cuales se agitaron (1 h a temperatura ambiente) y se centrifugaron (10.000 x g, 20 °C, 30 min). El espectro de emisión fue determinado entre 400-600 nm con un espectrofluorímetro FluoroMate FS-2 (Scinco, Corea del Sur). Se obtuvieron los espectros de emisión a diferentes concentraciones de ANS (de 0 a 100 $\mu\text{mol/L}$) y se corrigieron sustrayendo el blanco (solución de cada concentración de ANS en el mismo *buffer*), y se determinó el aumento de la intensidad de fluorescencia emitida (ΔF_I) como resultado de la unión proteína-ANS. El ΔF_I a 465 nm (longitud de onda de máxima emisión de fluorescencia del complejo proteína-ANS) fue graficado en función a la concentración de ANS ($\mu\text{mol/L}$), y la curva se ajustó a la siguiente ecuación:

$$\Delta FI = \frac{AxANS}{B+ANS} \quad (\text{Ec. 11})$$

Donde: los coeficientes son A = $\Delta FI_{\text{máx}}$ ($\Delta FI_{\text{máx}}$ es el cambio de intensidad de fluorescencia en la saturación de ANS) y B = 1/Ka (Ka es la constante de asociación del complejo proteína-ANS). La Ho es proporcional a $\Delta FI_{\text{máx}}$ por mg de proteína, por lo tanto, se calcula dividiendo el coeficiente A estimado de la ecuación 11 por los mg de proteína determinados en la dispersión proteica por el método de Lowry y col. (1951).

III.3.7. Solubilidad

III.3.7.1. En distintos solventes

La Solubilidad (So) de las fracciones proteicas ALB y GLB, así como de los aislados proteicos se midió en agua destilada, *buffer A* y *buffer B* (ítem III.3.3.1 y III.3.3.2, respectivamente) utilizando el método de Bera y Mukherjee (1989). Se prepararon dispersiones proteicas de 0,1% p/v de proteína que fueron agitadas (30 min a temperatura ambiente) y luego centrifugadas (10.000 x g, 20 °C, 30 min). La So se expresó como la relación porcentual entre la proteína soluble en los sobrenadantes determinada por el método de Lowry (Lowry y col., 1951), utilizando seroalbúmina bovina como patrón, y el contenido proteico total de las muestras liofilizadas, determinado por el método de microKjeldhal (AOAC, 1990).

III.3.7.2. En función del pH

Se determinó la Solubilidad (So) de las fracciones proteicas ALB y GLB, y de aislados proteicos en función del pH mediante el método de Were y col. (1997). Se prepararon dispersiones proteicas de 0,1% p/v en agua destilada, y las soluciones se ajustaron a distintos pH (2-10) utilizando 0,1 N NaOH o HCl. Las dispersiones se agitaron (30 min a temperatura ambiente) y luego se centrifugaron (10.000 x g, 25 °C, 30 min). El contenido de nitrógeno inicial de las muestras se determinó por microKjeldhal (AOAC; 1990) y el contenido de proteína de los sobrenadantes se determinó por el método de Lowry (Lowry y col., 1951), utilizando seroalbúmina bovina como patrón.

III.3.8. Color

El color es una característica de calidad de gran importancia, dado que es el primer aspecto que perciben los consumidores o usuarios, y puede determinar la aceptación o rechazo de un producto y su valor (Wu y Sun, 2013). Se evaluó el color de aislados proteicos para lo cual se realizaron mediciones con un colorímetro Chroma Meter CR-300C (MINOLTA, Japón). La luminosidad de los aislados proteicos se determinó por

Capítulo III

medio del parámetro L^* , el equilibrio entre el color verde y rojo por el valor a^* , y el equilibrio entre el amarillo y el azul por medio del valor b^* . A partir de estos parámetros se calcularon los atributos de color (hue, H^*) e intensidad del color (chroma, C^*):

$$H^* = \operatorname{tg}^{-1} \times \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \text{ cuando } a^* > 0 \quad (\text{Ec. 12})$$

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (\text{Ec. 13})$$

Los resultados presentados son los valores promedio de 10 determinaciones efectuadas en cada muestra.

III.4. Influencia del pH y la fuerza iónica

III.4.1. Soluciones reguladoras del estado ácido-base y de la fuerza iónica (*buffers*)

Para el estudio de la influencia del pH y fuerza iónica sobre las propiedades tecnofuncionales del aislado A8, se ensayaron cuatro condiciones de pH (2,1; 3,9; 6,3 y 8,3) y dos condiciones de fuerza iónica (μ) (0,10 y 0,54), para lo que fue necesario preparar ocho soluciones reguladoras, cuya composición de detalla a continuación:

- pH 2,1; μ 0,10; 0,1 M fosfato (0,052 M H_3PO_4 ; 0,048 M KH_2PO_4 ; 0,052 M NaCl)
- pH 3,9; μ 0,10; 0,05 M citrato (0,033 M $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$; 0,0167 M $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)
- pH 6,3; μ 0,10; 0,06 M fosfato (0,047 M KH_2PO_4 ; 0,013 M K_2HPO_4)
- pH 8,3; μ 0,10; 0,035 M fosfato (0,033 M K_2HPO_4 ; 0,0017 M KH_2PO_4)
- pH 2,1; μ 0,54; 0,2 M fosfato (0,2M H_3PO_4 ; 0,443M NaCl)
- pH 3,9; μ 0,54; 0,05 M citrato (0,05M $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$; 0,455M NaCl)
- pH 6,3; μ 0,54; 0,12 M fosfato (0,086 M KH_2PO_4 ; 0,033M K_2HPO_4 ; 0,353M NaCl)
- pH 8,3; μ 0,54; 0,12 M fosfato (0,0036 M KH_2PO_4 ; 0,1162 M K_2HPO_4 ; 0,187M NaCl)

Las mismas se eligieron teniendo en cuenta el rango de pH y fuerza iónica que son de uso frecuente en la industria de alimentos (Giraudo y col., 2011; Ladjal-Etoumi y col., 2016; Tahaa y col., 2019; Zhou y col., 2016).

III.4.2. Propiedades físico-químicas y estructurales de A8

III.4.2.1. Electroforesis monodimensional (SDS-PAGE)

Se prepararon dispersiones proteicas de A8 de 0,1% p/v de A8 en los distintos *buffers* (ítem III.4.1), seguido de agitación constante (1 h, 25 °C) y se centrifugaron (10.000 x g, 30 min, 20 °C). Para la realización de electroforesis SDS-PAGE (ítem III.3.1.1), se mezclaron 3 volúmenes de cada sobrenadante con 1 volumen de *buffer* de

muestra 4x, luego de lo cual se sembraron en el gel (8-10 µg por calle). Se realizó tinción con Coomasie Brillant Blue R-250.

III.4.2.2. Medida del potencial Zeta

Una carga superficial en contacto con una solución de un electrolito se ve rodeada e interaccionando con iones de carga opuesta (contra-iones). Normalmente la distribución de contra-iones alrededor de una carga eléctrica se divide en una región interna y una externa. En la región externa la atracción entre los contra-iones y la superficie cargada es débil y la capa presenta cierta movilidad (comúnmente llamada capa difusa). A esta distribución de iones alrededor de una carga superficial se la suele llamar doble capa eléctrica. Dentro de la capa difusa existe un límite teórico dentro del cual los iones y la partícula cargada forman una entidad estable y se moverán juntas. Existe un potencial entre la superficie de las partículas y el líquido de dispersión, el cual presenta un valor máximo en la superficie y disminuye gradualmente con la distancia, aproximándose a cero fuera de la capa difusa. Este potencial se conoce como potencial Zeta.

Los valores del potencial Zeta de A8 suspendidos en agua se midieron mediante dispersión de luz láser dinámica utilizando un analizador de partículas nano SZ-100 (Horiba Scientific Inc., Reino Unido) a 25 °C. El potencial Zeta se determinó midiendo la dirección y la velocidad del movimiento de las partículas en un campo eléctrico bien definido. Para realizar la determinación se preparó una dispersión proteica 0,5% p/v en agua miliQ, se agitó durante 30 min a temperatura ambiente y se ajustó el pH con HCl 2 N y/o NaOH 2 N. Luego de ajustar el pH se agitó 30 min más, las dispersiones se centrifugaron ($10,000 \times g$, 30 min, 25 °C) y los sobrenadantes se filtraron a través de filtros de nylon de 0,45 µm de poro. Antes de la medición se realizó una dilución 1/5 (v/v) con agua mili-Q para obtener una solución 0,1% p/v.

III.4.2.3. Fluorescencia intrínseca

Se analizó la estructura terciaria de las proteínas de A8 estudiando la fluorescencia intrínseca de las mismas en los distintos *buffers* (ítem III.4.1). El ensayo se realizó con el mismo equipo y las mismas condiciones previamente detalladas (ítem III.3.5).

III.4.2.4. Estabilidad térmica

A su vez, para poder analizar el efecto del pH y la fuerza iónica sobre las características estructurales de A8, se prepararon dispersiones en las distintas soluciones *buffer* (ítem III.4.1) a una concentración de 2% p/v. Dichas dispersiones se agitaron durante 1 h, se congelaron a -20 °C y posteriormente se liofilizaron. Una vez obtenido el

Capítulo III

liofilizado del aislado tratado, se preparó una suspensión al 20% p/p en agua destilada para poder analizarla calorimétricamente. El ensayo se realizó con el mismo equipo y las mismas condiciones previamente detalladas (ítem III.3.2), variando únicamente la velocidad de calentamiento a 10 °C/min.

III.4.2.5. Solubilidad

Se determinó la solubilidad (So) de A8 para lo cual se prepararon dispersiones proteicas de 0,1% p/v de A8 en los distintos *buffers* (ítem III.4.1), seguido de agitación constante (1 h, 25 °C) y se centrifugaron (10.000 x g, 30 min, 20 °C). El ensayo se realizó en las mismas condiciones previamente detalladas (ítem III.3.7.1).

III.4.2.6. Tensión interfacial

El método del anillo de Du Noüy permite determinar la tensión superficial de un líquido a través de la fuerza requerida para retirar un anillo de platino-iridio de la superficie del líquido. Es una medición estática que se realiza en superficies o interfas es que se encuentren en equilibrio termodinámico. El recipiente que contiene el líquido es capaz de moverse hacia arriba o hacia debajo de manera controlada. El recipiente se posiciona de manera tal que el anillo quede sumergido justo debajo de la superficie del líquido que se analiza. Posteriormente, el recipiente va descendiendo lentamente y la fuerza ejercida sobre el anillo se va registrando, se forma un menisco de líquido y la fuerza ejercida pasa por un máximo y luego disminuye, desprendiéndose el líquido del anillo y volviendo a su posición original (Fig. III.2). La fuerza en el anillo es medida mientras que el recipiente que contiene el líquido desciende. El cálculo de la tensión superficial se basa en medir esa fuerza máxima, en la cual el ángulo de contacto es cero. La fuerza necesaria se relaciona con la tensión superficial γ de la siguiente manera:

$$\gamma = \frac{F_{exp}f}{4\pi r} \quad (\text{Ec. 14})$$

Donde F_{exp} es la fuerza aplicada al anillo al momento de desprenderlo, r el radio medio del anillo y f el factor de corrección. El factor de corrección f (Ec. 14) (Zuidema y Waters, 1941) se incluye a modo de corrección de las fuerzas de tensión que no están dirigidas verticalmente y de la forma del líquido al momento de desprenderse el anillo, con lo cual este factor depende de las dimensiones del anillo y de la naturaleza de la interfase.

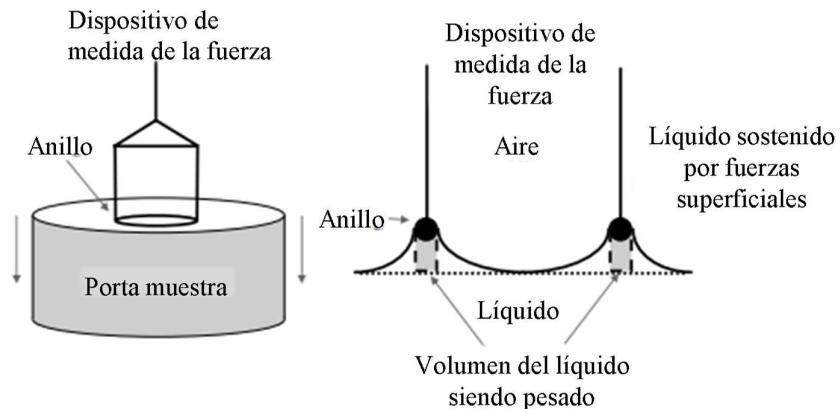


Figura III.2: Esquema del método del anillo de Du Noüy. Fuente: McClements (2016).

Para determinar la tensión interfacial entre dos líquidos, el recipiente se posiciona de manera tal que el anillo quede sumergido justo debajo de la superficie del líquido más denso (generalmente agua) y se coloca por encima el líquido menos denso (generalmente aceite). La fuerza ejercida sobre el anillo se mide a medida que el anillo asciende a través de la interfase y en la fase oleosa. Una ecuación similar a la Ecuación 14 se utiliza para determinar la tensión interfacial a partir de la fuerza, pero debe tenerse en cuenta las densidades de los líquidos y se utiliza un factor de corrección diferente (McClements, 2016).

Se prepararon dispersiones 0,5% p/p de proteína en los distintos *buffers* (ítem III.4.1), con agitación de 1 h, evitando la formación de espuma. Previo a la medida experimental se realizó la limpieza del anillo y de la cubeta que contuvo la solución a estudiar. Las medidas de tensión interfacial de equilibrio (γ_{eq}) se evaluaron con el tensiómetro de anillo Lauda TD3 (Lauda DR. R. Wobser GmbH & Co., Alemania), asociado a una unidad termostática Peltier, que permitió la regulación de la temperatura en 25 °C. Las medidas de tensión interfacial en la interfase aceite/agua (o/w) y en la interfase y aire/agua (a/w) se realizaron automáticamente fijando la amplitud constante de movimiento del anillo en la dispersión acuosa; en el caso de la interfase aceite/agua (o/w) se utilizó aceite refinado de girasol comercial (Cocinero, Molinos Río de La Plata). Como control se midió la tensión interfacial entre aceite de girasol y agua Milli-Q, y entre aire y agua Milli-Q (sin proteínas).

Capítulo III

III.4.3. Propiedades tecnofuncionales

III.4.3.1. Propiedades emulsionantes

III.4.3.1.1. Preparación de emulsiones

Las emulsiones o/w se prepararon a partir de 7 g de aceite refinado de girasol comercial (Cocinero, Molinos Río de La Plata) con 28 g de dispersión proteica de A8 (20% p/p de aceite). Las dispersiones proteicas fueron preparadas variando la concentración de proteína (0,5; 1,0; 1,5 y 2,0% p/p) en cada uno de los *buffers* descriptos previamente en el ítem 4.1. mediante agitación constante durante 1 h a 25 °C. Las emulsiones fueron prehomogeneizadas con un Ultraturrax T25 (Janke & Kunkel GmbH, Alemania) utilizando una herramienta de dispersión S25N-10G (diámetro del rotor 7,5 mm) a una velocidad de 20.000 rpm durante 1 min. Luego, se realizó una segunda homogeneización con un homogeneizador ultrasónico (Sonics Vibra Cell VCX500, EE. UU.) a una amplitud de 70% (350 W) aplicando pulsos de 30 s durante 5 min con una punta standard (13 mm de diámetro) inmersa 2/3 en un vaso de precipitado de 35 mm de diámetro (50 mL de volumen). El vaso se mantuvo en un baño de hielo para reducir el calentamiento durante el proceso de homogeneización final (Fig. III.3).



Figura III.3: Homogeneizador ultrasónico.

III.4.3.1.2. Distribución de tamaño de partícula

Este método se basa en el análisis de los espectros de difracción y de difusión de luz láser producidos por partículas que en este caso son las gotas de aceite de una emulsión o/w. La técnica se basa en la teoría de Fraunhofer y de Mie. Según Fraunhofer, el ángulo de difracción de la luz es mayor cuando el radio de las partículas es menor. Cuando el tamaño de las partículas se acerca al de la longitud de onda de la luz incidente (menos de

50 μm) se debe aplicar la teoría de Mie, similar a la de Fraunhofer, pero tiene en cuenta los índices de refracción complejos de la partícula y del medio dispersante. Se analizan las intensidades a los diferentes ángulos y los espectros de difusión (McClements, 2016). La luz dispersada es captada por un detector constituido por fotodiodos que reconstruyen un patrón de difracción de las distintas intensidades luminosas obtenidas en los distintos ángulos (Fig. III.4). Estos patrones son transformados en distribuciones de tamaño de partícula de acuerdo con la teoría de Mie.

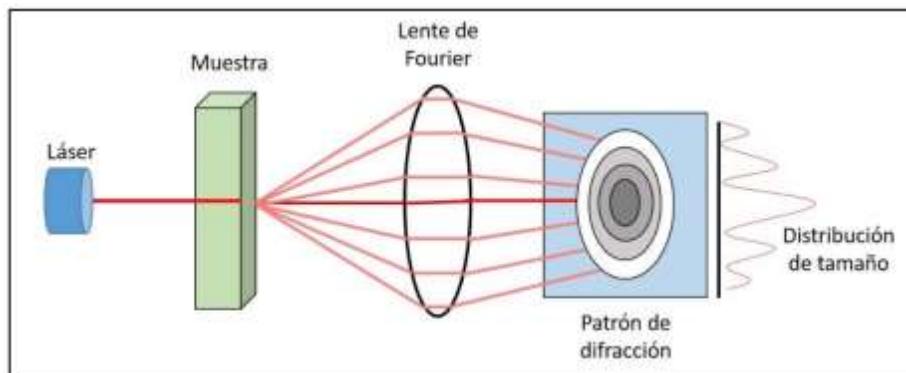


Figura III.4: Esquema que muestra el fundamento del análisis del tamaño de partícula por difracción de luz.

Las distribuciones de tamaño de partícula se determinaron en un analizador Malvern Mastersizer 2000E (Malvern Instrument Ltd, Reino Unido) asociado a una unidad de dispersión por vía húmeda (Hydro 2000 MU). Las medidas se realizaron en agua como dispersante y la velocidad de agitación en la unidad de dispersión fue de 2.000 rpm. Los parámetros ópticos seleccionados para la conversión del patrón de dispersión angular de luz en la correspondiente distribución de tamaño de partícula fueron: índices de refracción de la fase dispersa y del dispersante 1,47 y 1,33, respectivamente; coeficiente de absorción de la partícula 0,001.

A partir de la distribución de tamaño de partícula se obtuvieron los diámetros promedio: $D_{3,2}$ (diámetro promedio en superficie o diámetro de Sauter) y $D_{4,3}$ (diámetro promedio en volumen o diámetro de De Brouckere):

$$D_{3,2} = \sum_i^N \frac{d_i^3 \times n_i}{d_i^2 \times n_i} \quad (\text{Ec. 15})$$

$$D_{4,3} = \sum_i^N \frac{d_i^4 \times n_i}{d_i^3 \times n_i} \quad (\text{Ec. 16})$$

donde n_i es el número de partículas de diámetro d_i .

Capítulo III

El valor de $D_{3,2}$ da idea de la superficie creada durante la emulsificación (área superficial específica) y la distribución de tamaño de partícula en superficie muestra qué porcentaje de la superficie total creada está compuesta por gotas de los distintos rangos de tamaño. La distribución de tamaño en volumen representa el porcentaje de volumen total de aceite utilizado que forma parte de cada uno de los rangos de tamaño de gota de la distribución. El diámetro $D_{4,3}$ está directamente asociado a la distribución en volumen y es más sensible a la presencia de partículas de mayor tamaño. Además, se determinó el índice de polidispersidad (span), el cual es una medida del ancho de la distribución y se calcula como:

$$Span = \frac{d(x,0,9) - d(x,0,1)}{d(x,0,5)} \quad (\text{Ec. 17})$$

donde $d(x,0,1)$, $d(x,0,5)$ y $d(x,0,9)$ son los percentiles estándar del análisis, y x representa la distribución elegida. En nuestro trabajo se consideró la distribución de volumen.

Se realizaron medidas en ausencia y en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS). El SDS es utilizado para evitar la floculación de las partículas ya que carga negativamente a las moléculas de proteína o, con el tiempo, reemplaza a las mismas de la interfase y produce repulsión electrostática entre las gotas. Primero se midió la distribución de tamaño de gota de la emulsión recién preparada sin SDS, utilizando entre 100-1000 μL de muestra (lo necesario para alcanzar un nivel de *laser obscuration* entre 10 y 20%) que se diluyeron en 600 mL de agua contenida en un vaso de precipitado con agitación constante. Para realizar la medida con SDS se realizó una dilución (1/3) de la emulsión con una solución de SDS 1% p/v, homogeneizando suavemente y midiendo la distribución de tamaño de partícula luego de 5 min de estabilización. Las emulsiones se almacenaron en heladera a 4 °C para determinar el tamaño de partícula luego de 24 h y siete días de almacenamiento.

La variación de los valores del $D_{4,3}$ a diferentes tiempos, en presencia y ausencia de SDS se utilizaron para calcular el índice de floculación (IF) y el índice de coalescencia (IC) descripto por Palazolo y col. (2005).

$$IF = \frac{D_{4,3} t - D_{4,3} t+SD}{D_{4,3} t+SD} \quad (\text{Ec. 18})$$

$$IC = \frac{D_{4,3} t+SD - D_{4,3} in+SD}{D_{4,3} t+SD} \quad (\text{Ec. 19})$$

donde $D_{4,3} t$ es el valor de $D_{4,3}$ a un cierto tiempo t , $D_{4,3} t+SD$ es el valor de $D_{4,3}$ a un cierto tiempo t en presencia de SDS, $D_{4,3} in+SD$ es el valor inicial de $D_{4,3}$ en presencia de SDS.

III.4.3.1.3. Viscosidad aparente de emulsiones

La viscosidad mide la habilidad de los materiales a resistir al flujo y a la deformación gradual al aplicar un esfuerzo de corte. Para alimentos semisólidos, la viscosidad se refiere a la viscosidad aparente que se calcula de la siguiente manera:

$$\eta = \frac{\tau}{\left(\frac{\Delta u}{\Delta x}\right)} \quad (\text{Ec. 20})$$

donde η es la viscosidad aparente (Pa.s), τ es esfuerzo de corte (Pa) y $\frac{\Delta u}{\Delta x}$ es la velocidad de gradiente (1/s). Dependiendo de la geometría usada para la medición de viscosidad, la velocidad de gradiente se puede representar como velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$); por ejemplo, cuando se utilizan platos paralelos (Tan, 2019). La medición de la viscosidad de un material en un rango de velocidades de deformación permite obtener un perfil de flujo. Este flujo puede usarse para predecir la viscosidad del material y los comportamientos de flujo bajo un rango de condiciones de procesamiento industrial.

La viscosidad de las emulsiones recién preparadas se determinó a 20 °C utilizando un Reómetro Discovery HR 1 (TA Instrument Inc., EE. UU.) con un sensor plato-plato con un gap de 45,0 mm entre los platos. La viscosidad aparente (η_{app}) de las emulsiones fue determinada aumentando la velocidad de deformación de 20 a 500 s⁻¹ en 120 s.

III.4.3.1.4. Microscopía confocal de barrido

Las muestras fueron analizadas con un microscopio confocal invertido (LEICA TCS SP5, Alemania) equipado con láseres de Argón y HeNe. Se realizó un marcado no covalente de las proteínas, para lo cual a 200 µL de emulsión se le agregó 5 µL de una solución de rodamina B (Biopack) (solución acuosa al 0,1% p/v), se homogeneizó cuidadosamente y se dejó en reposo durante 30 min en la oscuridad. Para la observación microscópica, se colocó la emulsión en un portaobjetos y se utilizó como longitud de onda de excitación 568 nm (para rodamina B) y como longitud de onda de emisión 625 nm. Se realizaron observaciones de varios campos con diferentes aumentos: 20X, 63X, 63X + zoom óptico (2,5). El análisis de las imágenes se realizó con el programa provisto por el fabricante del microscopio: LAS AF versión 2.2.1. build 4842.

Los parámetros de captura utilizados fueron:

- Resolución: 1024 X 1024 pixeles
- Modo de adquisición: xyz
- Formato: lif

Capítulo III

- Objetivos utilizados: HCX PL APO CS 20,0X (inmersión con agua) y HCX PL APO CS 63,0X (inmersión con aceite)
- Apertura numérica: 0,70 para el objetivo de 20 X y 1,40 para el objetivo de 63X
- Velocidad de escaneo: 200 Hz
- Láser de Argón: 20%

III.4.3.1.5. Estabilidad de las emulsiones

Las emulsiones fueron analizadas utilizando un analizador óptico vertical de barrido Turbiscan MA 2000 (Formulaction, Francia). La medida se basa en la aplicación de una fuente lumínica laser en el infrarrojo cercano (850 nm) a la celda de medida que contiene la emulsión. Dos sensores ópticos sincronizados reciben respectivamente la luz transmitida a través de la muestra (180° desde la luz incidente, sensor de transmisión), y la dispersada por la muestra (45° desde la radiación incidente, detector de backscattering (BS)) (Fig. III.5). Tanto la fuente de luz como los dos detectores se mueven a lo largo de la celda de medida, periódicamente, para analizar la emulsión en toda su extensión. Se obtuvieron los perfiles de BS a diferentes tiempos de almacenamiento. Estos perfiles representan la intensidad de luz dispersada (%) en función de la altura de la celda de medida. El análisis completo de datos permite determinar los fenómenos de migración y agregación de las partículas.

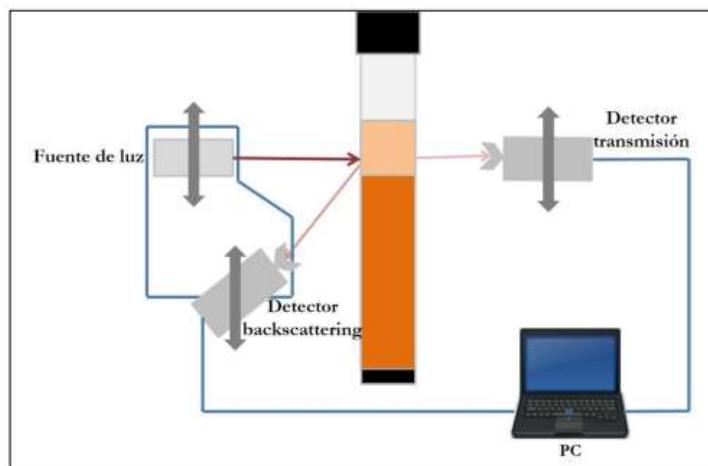


Figura III.5: Esquema sencillo del fundamento de funcionamiento del analizador Turbiscan.

Inmediatamente finalizada la homogenización se colocó aproximadamente 6 mL de emulsión en la celda de medida y se la ubicó en el equipo. Las emulsiones preparadas se monitorearon cada 2 min durante 1 h, luego una medida puntual cada hora (3 h siguientes)

y cada 24 h durante siete días. Las celdas se almacenaron a 4 °C y se retiraron de la heladera media hora antes de la medición para estabilizar su temperatura con la ambiental. Se obtuvieron las cinéticas de cremado-floculación y coalescencia-floculación registrando la variación del %BS promedio (BS_{prom}) en función del tiempo en la parte inferior (10-15 mm desde la base) y superior (40-50 mm desde la base) de la celda, respectivamente (Fig. III.6).

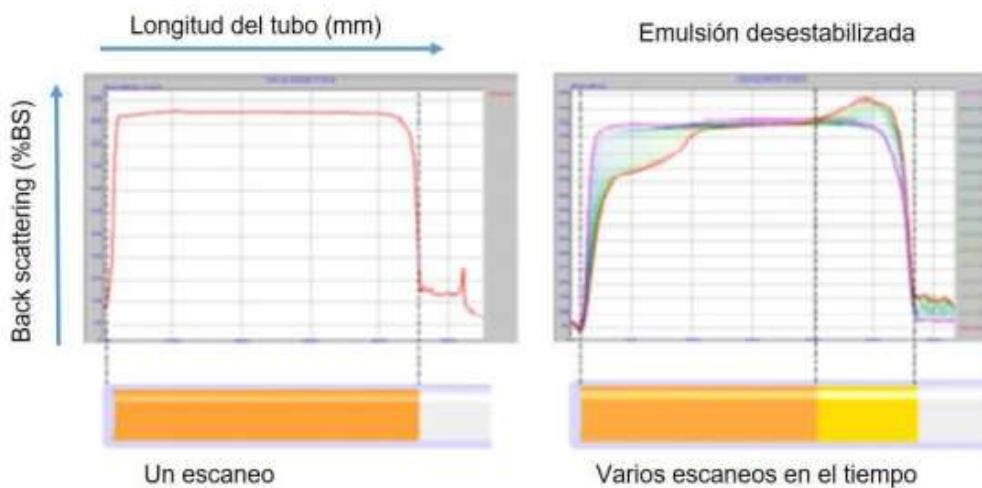


Figura III.6: Cinética de desestabilización global de una emulsión típica, evaluada a través de la variación temporal de los perfiles de backscattering (%BS). Figura tomada del manual de instrucciones del equipo (Formulaction, Francia).

III.4.3.2. Propiedades espumantes

III.4.3.2.1. Preparación de espumas

Las propiedades de formación y estabilidad de las espumas se evaluaron mediante el método desarrollado por Loisel y col. (1993) con algunas modificaciones. La espuma se formó por burbujeo de nitrógeno en la dispersión de proteínas. El gas atraviesa la placa de vidrio fritado G4 (5-15 μm de poro) y burbujea en 6 mL de dispersión proteica de concentración 0,1 y 0,5% p/p en los distintos *buffers* (ítem III.4.1). Sabiendo que la conductividad de la solución es inversamente proporcional al volumen de líquido incorporado en la espuma, fue posible el seguimiento de la evolución temporal de la espuma durante el burbujeo y posterior al mismo mediante medidas conductimétricas de la solución remanente y captura de imágenes digitales de la espuma formada. El equipo utilizado está formado por una columna de 2,35 cm de diámetro interno y 27,5 cm de largo abierto en los extremos, a la cual se le adosa en la parte inferior un receptor de su mismo diámetro sujetado a presión (Fig. III.7). El último permite la conexión entre el tubo

Capítulo III

y el equipo de burbujeo; contiene en su parte media un vidrio fritado que posibilita la contención de la solución y el pasaje del gas. Adosado a las paredes de la columna hay un par de placas metálicas de área “A” que permiten medir la conductividad de la dispersión.

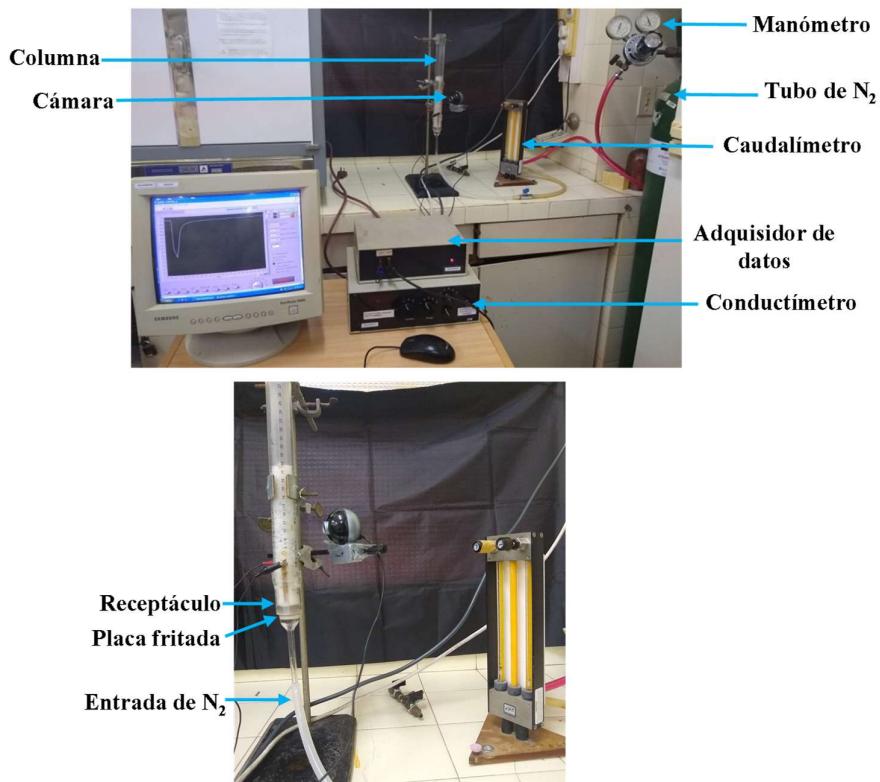


Figura III.7: Espumómetro utilizado para la evaluación de las propiedades de formación y estabilidad de las espumas (CIDCA, UNLP).

Antes de realizar la medida experimental se limpió el receptáculo donde se encuentra la placa fritada con HNO₃ 85 % p/v durante 12 h y se enjuagó varias veces con agua destilada. El burbujeo de nitrógeno se realizó a un caudal inicial de 80 mL/min durante 30 s. Los datos experimentales se adquirieron con el programa Cortidat 01- Lec (2008) a través de un adquisidor de datos de 2 canales voltímetro micro-controlado con comunicación en serie a la computadora, ambos desarrollados por personal del CIDCA (UNLP, Bs. As.). Los datos obtenidos durante el período de burbujeo se extrajeron para el análisis de los parámetros de formación. A partir del cese del burbujeo se consideró t= 0 s para el análisis de los parámetros de desestabilización de la espuma.

Teniendo en cuenta que la conductancia (C) depende de la conductividad del medio (c), del área de cada placa (A) y de la distancia de separación entre ellas (L), se plantea la siguiente ecuación:

$$C = c \times \frac{A}{L} \quad (\text{Ec. 21})$$

Aplicando la Ecuación 21, se puede calcular el volumen del líquido remanente (V_{LS}) y del líquido incorporado en la espuma (V_{LE}) (Ec. 22).

$$V_{LS_t} = V_{LS_0} \times \frac{C_0}{C_t} \quad (\text{Ec. 22})$$

$$V_{LE_t} = V_{LS_0} - V_{LS_t} \quad (\text{Ec. 23})$$

donde V_{LS_0} es el líquido inicial en el recipiente, C_0 corresponde a la conductancia inicial antes del burbujeo, C_t a la conductancia en el tiempo t y V_{LS_t} es el volumen de líquido remanente en el tiempo t .

Para analizar la espuma visualmente, se adosó una cámara web a la columna de burbujeo, a fin de obtener imágenes durante su formación y desestabilización. Las imágenes digitales se obtuvieron con una cámara de video tipo web, controlada desde la computadora por medio del programa SupervisionCam (Versión 3.05.14). Se obtuvieron imágenes cada 30 s, los primeros 3 min desde el inicio del burbujeo y luego cada 1 min hasta el final de las experiencias. Las imágenes se obtuvieron en formato JPEG de dimensiones 640 x 480 píxeles.

Capacidad de formación de espuma

Para analizar esta propiedad de la espuma, se calcularon los siguientes parámetros a partir de los datos experimentales:

- Volumen de líquido incorporado en la espuma (V_{LE}): volumen de líquido incorporado en la espuma al finalizar el burbujeo.
- Velocidad máxima de incorporación de líquido en la espuma (v_0): se calculó como la pendiente máxima de la gráfica V_{LE} vs t , $\left(\frac{d(V_{LE})}{d(t)}\right)_t$ máx, durante el burbujeo, la cual corresponde a la pendiente en el punto t donde $\frac{d(V_{LE})^2}{d(t)^2} = 0$
- Volumen de espuma (V_{esp}): volumen de espuma formado al final del burbujeo. Se obtiene de la ecuación 24 a partir de la lectura visual de la altura de la espuma, h , en la escala graduada de la columna de diámetro d .

$$V_{esp} = \pi \left(\frac{d}{2}\right)^2 \times h \quad (\text{Ec. 24})$$

Capítulo III

- Densidad de la espuma (δ_{esp}): Se calculó a partir de la relación entre V_{LE} y V_{esp} al final del burbujeo.

$$\delta_{esp} = \frac{V_{LE}}{V_{esp}} \quad (\text{Ec. 25})$$

III.4.3.2.2. Estabilidad

Para evaluar la estabilidad de las espumas, se calcularon en primera instancia los siguientes parámetros considerando $t = 0$ s en el cese del burbujeo (Fig. III.8):

- Tiempo medio ($t_{1/2}$): tiempo transcurrido desde el cese del burbujeo hasta el drenado de la mitad del volumen de líquido incorporado a la espuma.
- Volumen de líquido en la espuma a los 8 min (V_8): volumen de líquido remanente en la espuma a los 8 min desde el cese del burbujeo. Es un parámetro que permite estimar la estabilidad de la espuma por procesos de difusión y colapso.

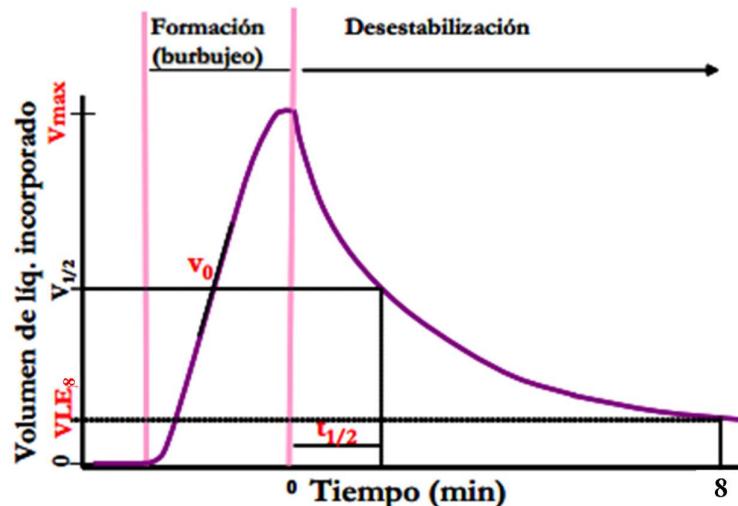


Figura III.8: Volumen de líquido incorporado en la espuma en función del tiempo para un ensayo de evaluación de la capacidad de formación y estabilidad de la espuma.

Modelado de la desestabilización de la espuma

El fenómeno de desestabilización de la espuma se interpretó como dos procesos que ocurren en simultáneo. Por un lado, el drenado del líquido por gravitación, y por otro el drenado a causa de la difusión y colapso (Wright y Hemmant, 1987; Yu y Damodaran, 1991). El modelo matemático utilizado para el ajuste de los datos experimentales es un modelo bifásico exponencial de primer orden (Ec. 26).

$$V_{LE}(t) = V_g e^{(-t/\tau_g)} + V_{dc} e^{(-t/\tau_{dc})} \quad (\text{Ec. 26})$$

donde el primer término refiere al proceso de drenado gravitacional (g), y el segundo al drenado por difusión y colapso (dc). Con la aplicación del modelo se ajustan cuatro parámetros, dos que se corresponden a la amplitud de cada proceso (V_g , V_{dc}), y dos parámetros cinéticos que corresponden al tiempo de relajación de cada uno, τ_g y τ_{dc} . El parámetro V_{LE} para distintos t se calculó por medio de la inclusión de los valores de V_{LS} , obtenidos experimentalmente, en la ecuación 21.

Los datos experimentales se ajustaron al modelo con el programa OriginPro 8 SR0 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA 01060, EE. UU.).

III.4.3.3. Gelificación

III.4.3.3.1. Mínima concentración de gelificación

La mínima concentración de gelificación (LGC) se determinó mediante el método de Coffmann y García (1977) con algunas modificaciones. Se prepararon dispersiones de A8 en concentraciones entre 6,0 y 14,0% p/p (incrementando de a 2,0%) en los distintos *buffers* (ítem III.4.1) en tubos *eppendorf* con un volumen final de 1 mL. Las dispersiones fueron calentadas en un baño de agua hirviendo por 30 min, seguido de enfriamiento bajo corriente de agua fría hasta temperatura ambiente y luego fueron refrigeradas a 4 °C durante toda la noche. La LGC se determinó como la mínima concentración ensayada a la cual al invertir el tubo *eppendorf* la dispersión proteica no se deslizaba por las paredes. Las dispersiones se desmoldaron y se determinó visualmente su consistencia (Fig. III.9), clasificando como (-) dispersión proteica líquida, (+/-) dispersión proteica viscosa, (+) gel débil (una vez desmoldado pierde su forma), (++) gel auto-portante (una vez desmoldado mantiene su forma), (+++) gel muy firme.



Figura III.9: Fotografía de dispersiones de A8 desmoldadas para evaluar su consistencia.

Capítulo III

III.4.3.3.2. Reología dinámica de pequeña deformación

Para estudiar el proceso de gelificación térmica de A8 en las distintas condiciones de pH y μ , se prepararon dispersiones de A8 al 8,0 y 10,0% p/p en los *buffers* detallados previamente (ítem III.4.1) (agitación constante, 45 min, 25 °C). Los ensayos se realizaron en un Reómetro Discovery HR 1 (TA Instrument Inc., EE.UU.), usando un sensor de geometría plato-plato de 40 mm de diámetro y separación de 1 mm con control de temperatura y rampa de calentamiento-enfriamiento a través de un sistema Peltier. El rango de viscoelasticidad lineal fue determinado a una frecuencia de 1 Hz. Luego se seleccionó una deformación de 1% que pertenecía al rango de viscoelasticidad lineal y una frecuencia de 1 Hz para realizar las mediciones de los módulos G' y G'' en función del tiempo y la temperatura. Las dispersiones proteicas se colocaron sobre el plato inferior y se aplicó silicona de baja viscosidad alrededor del borde de los platos, para impedir la deshidratación de la muestra. El ciclo térmico consistió en una etapa de calentamiento de las dispersiones desde 20 °C hasta alcanzar la temperatura de *plateau* (95 °C) (a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min) seguido de etapa de *plateau* (isotérmica de 20 min), para terminar con una etapa de enfriamiento hasta alcanzar 20 °C (velocidad de enfriamiento 10 °C/min).

Parámetros utilizados para el estudio del proceso de gelificación térmica

- Módulo elástico [G' (Pa)] y módulo viscoso [G'' (Pa)]: se obtuvieron a partir de las curvas de G' y G'' en función del tiempo, al finalizar el *plateau* (G' -95 °C) y al finalizar la etapa de enfriamiento (G' -20 °C), a frecuencia de 1 Hz y una deformación del 1%.

- $\tan \delta$: tangente del ángulo de desfasaje, cociente entre G'' y G' a frecuencia de 1 Hz y una deformación del 1%. Se evaluó al finalizar el *plateau* (G' -95 °C) y al finalizar la etapa de enfriamiento (G' -20 °C).

- Punto de entrecruzamiento (PEC): tiempo de *plateau* o temperatura de calentamiento o enfriamiento en que G' igualó a G'' , a 1 Hz.

- Q : cociente entre los valores de G' , a 1 Hz, al final y al inicio de la etapa de enfriamiento del ciclo. Representa el crecimiento relativo de la elasticidad de la dispersión durante esta etapa.

III.4.3.3.3. Obtención de geles por tratamiento térmico

Se prepararon dispersiones de A8 al 8,0 y 10,0% p/p en los *buffers* detallados previamente ítem III.4.1) (agitación constante, 45 min, 25 °C). Las dispersiones se

colocaron en tubos de vidrio de 15 mm de diámetro, cerrados en los extremos con tapones de goma desmontables (Fig. III.10), luego fueron colocados en un baño maría termostatizado a 100 °C durante 30 min para obtener los geles proteicos. Al finalizar el tratamiento térmico se enfriaron rápidamente bajo corriente de agua fría hasta alcanzar temperatura ambiente y los geles se almacenaron en los mismos tubos de vidrio a 4 °C durante 24 h hasta su análisis.



Figura III.10: Tubos de vidrio con tapones desmontables con dispersiones proteicas de A8 para obtener geles por tratamiento térmico.

III.4.3.3.4. Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua (WHC) se ensayó por centrifugación a baja velocidad recogiendo el líquido perdido (Puppo y col., 1995; Avanza y col., 2005b). Los geles obtenidos (ítem III.4.3.3.3) se equilibraron a 25 °C y se desmoldaron cuidadosamente, sin perder líquido exudado, sobre una membrana de Nylon (diámetro de poro 5,0 µm Micronsep) soportada en un disco de acrílico que luego fue mantenido en el medio de un tubo de centrífuga de 50 mL, como se muestra en la Figura III.11. Las muestras se centrifugaron (5 min, 500 x g, 20 °C) todo el líquido perdido en la parte inferior del dispositivo fue recogido. Se determinó el peso de la muestra antes y después de centrifugar y WHC se expresó como el porcentaje de agua que quedó retenida luego de la centrifugación:

$$WHC (\%) = \frac{\text{peso pelle}}{\text{peso muestra inicial}} \times 100 \quad (\text{Ec. 27})$$



Figura III.11: Fotografía del dispositivo utilizado para la determinación de WHC.

III.4.3.3.5. Color

Se prepararon geles al 10% p/p (ítem III.4.3.3.3) y una vez listos fueron colocados en una placa de Petri sobre un fondo blanco, de manera de obtener un espesor constante (9 mm). El ensayo se realizó con el mismo instrumento y los mismos parámetros detallados previamente (ítem III.3.8). Los resultados presentados son los valores promedio de 10 determinaciones efectuadas en cada duplicado de muestra.

III.4.3.3.5.1. Polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales en el aislado A8 se determinó de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu descripto por Vázquez y col. (2008) de la siguiente manera: a 0,6 mL de agua destilada se adicionaron 10 μ L de una solución del aislado A8 (10 mg/mL) y 50 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu (Biopack, Argentina), se agitó y se dejó reposar 1 min. Se añadieron 150 μ L de carbonato de sodio (20% p/v) y el volumen se ajustó a 1 mL con agua destilada. Las muestras se incubaron 2 h en oscuridad a 25 °C. La absorbancia se midió a 760 nm. Para la curva de calibrado se utilizó ácido gálico como patrón. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico equivalentes/g de A8 (mg AGE/g).

III.4.3.3.6. Microscopía electrónica de barrido

Se prepararon geles al 10% p/p (ítem III.4.3.3.3). Se tomaron muestras de 2 mm de espesor y se fijó químicamente la red proteica conservándolas durante 48 h en glutaraldehído al 2,5% v/v. Se seccionaron porciones de 1 mm^3 y se procedió a una deshidratación creciente, con acetona 25, 50, 70 y 90% v/v en agua a temperatura ambiente durante 10 min. Se hicieron tres lavados de 30 minutos cada uno, con acetona 100%. Las muestras fueron luego sometidas a un secado por punto crítico, en un equipo Polaron, donde se intercambió la acetona por CO₂ líquido. Finalmente, las muestras se montaron

sobre cinta doble faz y fueron recubiertas con una fina capa de oro en un equipo de evaporación de metales en plasma de Argón para minimizar los efectos de carga y para aumentar la densidad electrónica superficial (Hermansson y Langton, 1994). La observación se realizó en un microscopio de barrido JEOL 35 CF con una aceleración de voltaje 5 KV.

III.4.3.3.7. Perfil de textura de geles proteicos

Se prepararon geles al 10% p/p (ítem III.4.3.3.3) y se cortaron cilindros de 15 mm de altura y 15 mm de diámetro. Los geles se comprimieron 20% de su altura original (Puppo y Añón, 1998), confirmando que no ocurría fractura del material, en un analizador de textura EZ-LX (Shimadzu Co., Japón). Se ensayó una prueba de compresión uniaxial de dos ciclos (Steffe, 1996), en platos paralelos con una sonda de 20 mm de diámetro a una velocidad constante de 0,5 mm/s.

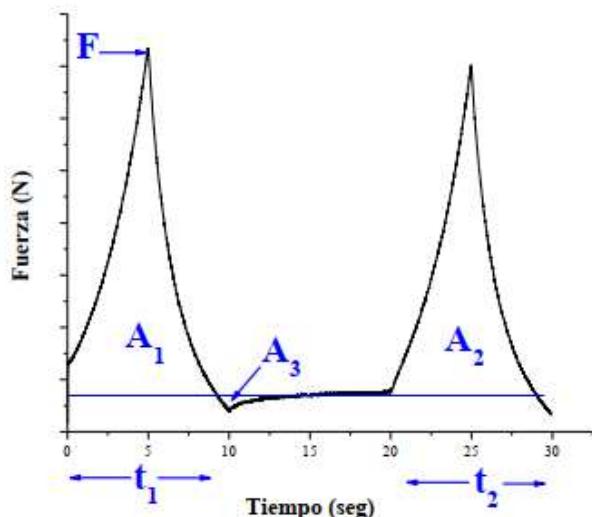


Figura III.12: Curva típica del perfil de textura (Fuerza en función del tiempo).

Parámetros: dureza (F); adhesividad (A_3), cohesividad (A_2/A_1) y elasticidad (t_2/t_1).

A partir de las curvas de fuerza en función del tiempo (Fig. III.12) se calcularon los parámetros de dureza, adhesividad, cohesividad y elasticidad de los geles utilizando el software OriginPro 8. La dureza de los geles se expresó como la fuerza aplicada para realizar la primera compresión (F) y representaría la resistencia del gel. La adhesividad, es el trabajo necesario para separar la sonda de la muestra (A_3) y representa la capacidad del gel de pegarse a otros materiales, se encuentra influenciada tanto por las fuerzas atractivas entre la superficie del gel y la superficie de otros materiales, como por las fuerzas dentro del gel y su capacidad de deformarse (elasticidad y viscosidad). La cohesividad (A_2/A_1), es

Capítulo III

la relación entre el trabajo realizado en cada compresión, es función directa del trabajo necesario para vencer las uniones internas del material. La elasticidad (t_2/t_1) es la habilidad para recuperar la forma original del gel, está relacionado a la altura que el material recupera entre el final de la primera compresión y el comienzo de la segunda (Bourne, 1968; Pilosof, 2000b).

III.5. Análisis estadístico de los datos

Todos los tratamientos y análisis experimentales se realizaron por duplicado. Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) y la comparación de medias se realizó con la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) con un intervalo de confianza de 95%. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Infostat (Di Rienzo y col., 2016).

Resultados y Discusión

Capítulo IV

Fracciones proteicas y aislados
proteicos de *Cajanus cajan*

IV.1. Fracciones proteicas mayoritarias. Rendimientos de extracción

A partir de harina desgrasada de CC ($22,30 \pm 0,81\%$ p/p de proteína bruta (Nx6,25)), se lograron obtener las fracciones proteicas mayoritarias ALB y GLB. En la Tabla IV.1 se presentan los rendimientos de extracción. La fracción GLB es la predominante en las legumbres, sin embargo, los rendimientos de proteína extraída fueron menores a lo esperado y a los obtenidos por otros autores (50-60% del total de proteína) (Singh y col., 1990; Singh y Jambunathan, 1982). A pesar de ello, el contenido proteico de la fracción GLB fue elevado ($90,84 \pm 2,04\%$ p/p, Nx6,25).

Tabla IV.1: Rendimientos de extracción de fracciones proteicas mayoritarias

	Rendimiento en peso (%)	Proteína bruta (Nx6,25) (%)	Rendimiento en proteína (%)
ALB	$30,55 \pm 1,18\text{a}$	$19,25 \pm 0,65\text{b}$	$26,58 \pm 1,19\text{a}$
GLB	$6,57 \pm 1,2\text{b}$	$90,84 \pm 2,04\text{a}$	$22,26 \pm 1,25\text{b}$

Promedio \pm desvío estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Además del método de extracción de Rosa y col. (2000) utilizado para la obtención de las fracciones proteicas, se ensayaron los métodos de Konishi y col. (1991) y de Gallegos Tintoré y col. (2004) para lograr obtener un mayor rendimiento de extracción de la fracción GLB. Se analizaron los perfiles electroforéticos SDS-PAGE de las fracciones ALB y GLB obtenidos por cada método y, considerando los patrones de bandas características de cada fracción, se concluyó que el método de Rosa y col. (2000) resultó el más apropiado para la extracción de las fracciones proteicas de CC al observar una menor contaminación cruzada entre ambas fracciones. De esta manera, los resultados de las propiedades fisicoquímicas obtenidos son representativos del comportamiento de cada fracción proteica. Diversos autores han empleado la técnica de Rosa y col. (2000) en otras legumbres con buenos rendimientos de extracción: *Lupinus albus* (Nadal y col., 2011), *Vigna unguiculata* (Avanza y col., 2015; Freitas y col., 2004) y *Vicia sativa* (Ribeiro y col., 2004).

IV.2. Aislados proteicos. Rendimientos de extracción y composición centesimal

En la Tabla IV.2 se presentan los rendimientos y composición centesimal en base seca de aislados proteicos obtenidos a pH 8,0, pH 9,0, pH 10,0 y pH 11,0 (A8, A9, A10, A11, respectivamente) a partir de harina de CC. Los aislados proteicos obtenidos presentaron entre 86-89% de contenido de proteína en base seca. El rendimiento en peso y en proteína de los mismos no varió con el pH de extracción ($p \geq 0,05$), excepto para A11, donde ambos rendimientos fueron mayores. Los valores de rendimiento en proteína fueron superiores a los obtenidos por Mwasaru y col. (1999a) para aislados de CC (35,1%-50,5%), preparados en un rango similar de pH. Por otro lado, Peyrano y col. (2016) informaron valores de recuperación proteica similares para aislados de *Vigna unguiculata* obtenidos a pH 8,0 y 10,0, empleando la misma técnica de extracción. El contenido de humedad fue superior para A8 mientras que el contenido de cenizas se incrementó con el pH de extracción, probablemente debido al mayor contenido de sales provenientes del uso de NaOH y HCl, empleados durante la extracción.

Tabla IV.2: Rendimientos de extracción y composición centesimal en base seca de aislados proteicos

	Rendimiento en peso (%)	Proteína bruta (Nx6,25) (% p/p)	Rendimiento en proteína (%)	Humedad (% p/p)	Cenizas (% p/p)
A8	$13,66 \pm 1,08\text{b}$	$86,26 \pm 2,20\text{b}$	$49,99 \pm 1,51\text{b}$	$6,98 \pm 0,28\text{a}$	$5,27 \pm 0,01\text{c}$
A9	$13,63 \pm 0,46\text{b}$	$88,90 \pm 0,61\text{a}$	$50,10 \pm 2,69\text{b}$	$5,75 \pm 0,08\text{b}$	$5,51 \pm 0,02\text{b}$
A10	$14,45 \pm 0,49\text{b}$	$85,61 \pm 1,54\text{b}$	$51,17 \pm 2,46\text{b}$	$5,83 \pm 0,05\text{b}$	$6,16 \pm 0,01\text{a}$
A11	$19,38 \pm 0,23\text{a}$	$89,16 \pm 0,82\text{a}$	$67,50 \pm 5,64\text{a}$	$6,08 \pm 0,11\text{b}$	$6,25 \pm 0,05\text{a}$

Promedio \pm desvío estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

IV.3. Caracterización físico-química y estructural de fracciones y aislados proteicos

IV.3.1. Electroforesis mono- y bidimensional

Los perfiles electroforéticos de las fracciones ALB y GLB en condiciones no reductoras se presentan en la Figura IV.1a. El perfil de la fracción ALB presentó polipéptidos de peso molecular (PM) de 72, 63, 55, 43, 38, 28-20 y 17 kDa. La fracción GLB presentó agregados proteicos que no ingresaron al gel concentrador (Fig. IV.1a,

recuadro violeta), agregados proteicos de PM >94 kDa en el gel separador y polipéptidos de 65, 52 y 47 kDa, los cuales pertenecen a las subunidades de vicilina 7S (Krishnan y col., 2017). A su vez, se observaron polipéptidos de peso molecular menor a 30 kDa, pero en menor proporción que en la fracción ALB. Los agregados proteicos de la fracción GLB (PM >94 kDa) podrían estar formados por vicilina 7S, así como lo sugieren Petruccelli y Añón (1995) para proteínas de soja. Bajo condiciones reductoras (Fig. IV.1b), en la fracción ALB las bandas de 43, 38 y 20 kDa se observan con mayor intensidad y aparece una nueva banda de PM <14 kDa (Fig. IV.1b, flechas naranjas). Por su parte, los agregados proteicos presentes en la fracción GLB se disociaron en especies de menor tamaño, lo cual fue evidente por el incremento en la intensidad de las bandas de vicilina 7S (65, 52 y 47 kDa), de los polipéptidos menores a 30 kDa y la aparición de polipéptidos de PM 30 kDa (Fig. IV.1b, flecha violeta). Todo esto indica que los agregados proteicos estaban estabilizados por puentes disulfuro. La presencia de bandas correspondientes a las subunidades de legumina 11S resulta difícil de confirmar, al estar en mucha menor proporción que vicilina 7S, como lo informaron Krishnan y col. (2017).

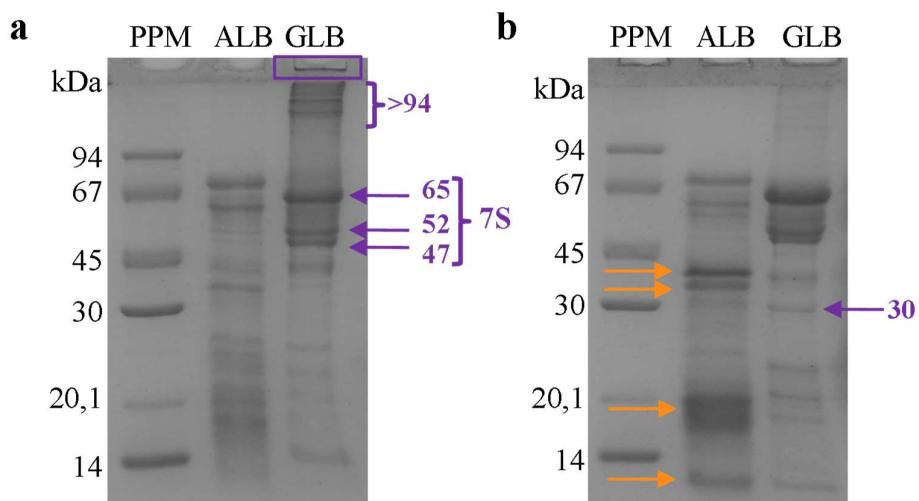


Figura IV.1: SDS-PAGE de ALB y GLB de CC. **a)** Condiciones no reductoras; **b)** Condiciones reductoras. PPM: patrón de peso molecular. Tinción: Coomassie blue.

Los aislados proteicos de CC presentaron perfiles electroforéticos similares entre sí, encontrándose bandas de polipéptidos de PM semejantes (Fig. IV.2a) (>94 , 65, 52, 47, 43, <28 kDa). Los polipéptidos correspondientes a vicilina 7S se encontraron en mayor proporción en comparación con aquellos relacionados a la fracción ALB. Estos resultados concuerdan con los reportados por Acevedo y col. (2013) para harina de CC. En condiciones no reductoras (Fig. IV.2a), se encontraron agregados proteicos (PM >94 kDa)

Capítulo IV

en el gel separador, que disminuyen con el incremento del pH de extracción mientras que aumenta la proporción de agregados que no ingresaron al gel concentrador (Fig. IV.2a, recuadro rojo). El incremento de agregados proteicos al aumentar el pH de extracción puede atribuirse a un reordenamiento de la estructura proteica como consecuencia de la desnaturalización de las proteínas causada por el pH.

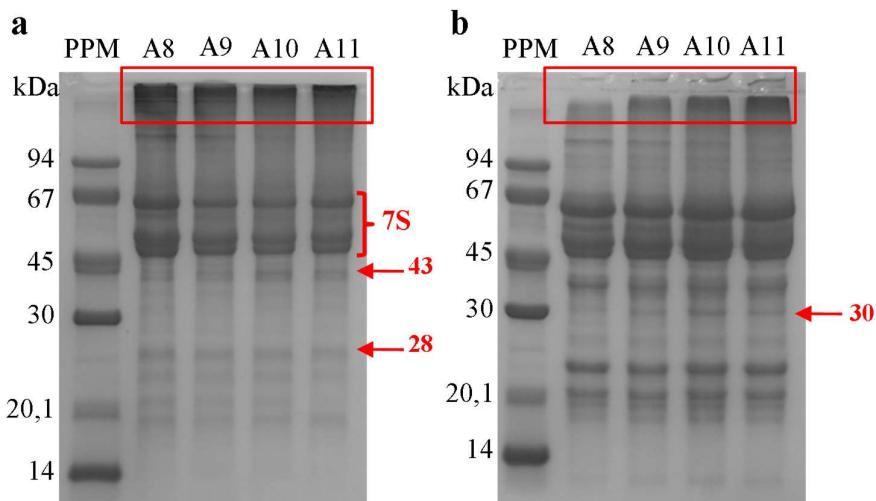


Figura IV.2: SDS-PAGE de aislados proteicos de CC. **a)** Condiciones no reductoras; **b)** Condiciones reductoras. PPM: patrón de peso molecular. Tinción: Coomassie blue.

Bajo condiciones reductoras (Fig. IV.2b), disminuyó la intensidad de los agregados proteicos, principalmente en A8 y A9, pero no desaparecieron (Fig. IV.2b, recuadro rojo); mientras que se incrementó la intensidad de las bandas de vicilina 7S y de polipéptidos entre 43 y 18 kDa. Además, se observa la aparición de una banda de 30 kDa. Estos resultados indican la presencia de puentes disulfuro en los agregados proteicos, sin embargo, su persistencia indicaría que otras interacciones podrían estar operando como resultado de la desnaturalización. Otros autores informaron un comportamiento similar luego de la desnaturalización proteica provocada por tratamientos térmicos (Alavi y col., 2021; Peyrano y col., 2016).

A través de electroforesis en dos dimensiones IEF/SDS-PAGE (Fig. IV.3), se analizó la heterogeneidad en la carga de los polipéptidos de las fracciones ALB y GLB y del aislado A8.

La fracción ALB (Fig. IV.3a) presentó polipéptidos con punto isoeléctrico (pI) mayores a pH 5, donde los polipéptidos de PM entre 72-63 kDa están formados por especies cuyo pI se encuentra en un rango de pH básicos (pH 7,7-8,6, PM ~72 kDa; pH 8,7-9,6, PM ~63 kDa). Para los polipéptidos de PM 43-40 kDa se observaron especies con

distintos pI (6,5-7,4), mientras que los polipéptidos de PM \leq 20 kDa presentaron un pI ligeramente ácido (pH 5,8 y 6,0). En la fracción GLB (Fig. IV.3b), la mayoría de las proteínas resueltas fueron agrupadas en una región de pH ácido (pH 4-7), aunque también se encontraron manchas de proteínas con pI básico. Debido a su abundancia, las proteínas mayoritarias de almacenamiento de CC no fueron claramente separadas en manchas individuales, como puede observarse en la Figura IV.3b cuando el PM de las proteínas es mayor a 45 kDa. Las proteínas más abundantes en la electroforesis bidimensional fueron identificadas como miembros de las GLB tipo vicilinas 7S (indicadas como 7S, 7S' y 7S'' en la Fig. IV.3b). A pH alcalinos ($>8,5$), se encuentran manchas mejor resueltas que podrían corresponderse a las subunidades básicas de legumina 11S (PM entre 20-30 kDa). Krishnan y col. (2017) encontraron resultados similares y propusieron que el agrupamiento apretado que observaron en el gel 2D puede deberse a que la fracción mayoritaria (vicilina 7S) son glicoproteínas que sufrieron modificaciones post-traduccionales, sin afectar de manera apreciable la masa de los polipéptidos, pero si su carga.

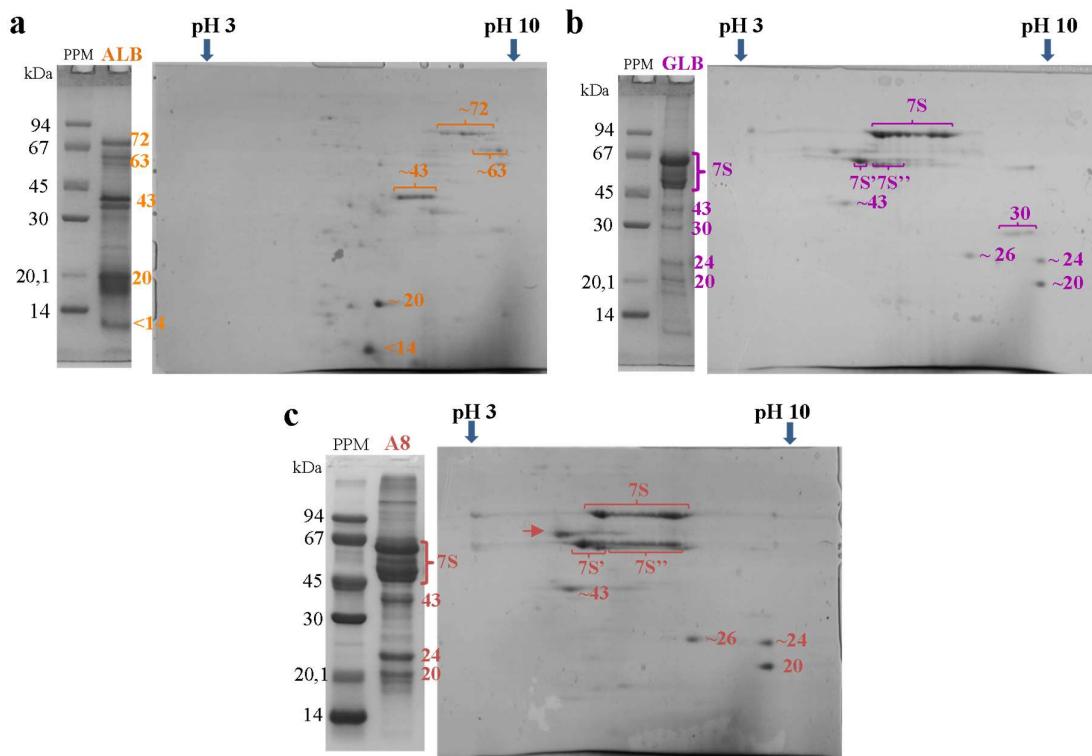


Figura IV.3: Electrophoresis bidimensional IEF/SDS-PAGE + 2ME de a) ALB, b) GLB y c) A8. En la figura se señalan los polipéptidos que se mencionan en el texto. A la derecha se observa el perfil SDS-PAGE + 2ME de la muestra y el patrón de peso molecular (PPM).

Capítulo IV

El patrón del perfil bidimensional del aislado A8 (Fig. IV.3c) resultó similar al de la fracción GLB, lo cual está relacionado a que esta fracción es la más abundante en las semillas de CC y que los aislados proteicos obtenidos por precipitación isoelectrónica están compuestos principalmente por la fracción GLB (Stone y col., 2015). Las manchas correspondientes a vicilinas 7S se observan con mayor intensidad que las obtenidas en la fracción GLB (Fig. IV.3b), además se destacan polipéptidos de pI entre 4,2-4,4 (Fig. IV.3c, flecha rosada).

IV.3.2. Estabilidad térmica

La desnaturación de proteínas por calor es el resultado de procesos endotérmicos (ruptura de asociaciones puente de hidrógeno) y exotérmicos (debilitamiento de interacciones hidrofóbicas y agregación de proteínas) (Li-Chan y Ma, 2002). La estabilidad térmica de las fracciones ALB y GLB, así como de aislados proteicos fue analizada por calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Fig. IV.4) y los parámetros empleados para el estudio de la desnaturación proteica fueron la temperatura de desnaturación (T_d) y la variación en la entalpía de transición (ΔH). En el caso de la fracción ALB (Fig. IV.4a) no fue evidente una transición térmica, por lo cual los parámetros mencionados no pudieron ser obtenidos. La naturaleza endotérmica de un termograma se asocia principalmente a la ruptura de puentes de hidrógeno (Arntfield y Murray, 1981), por lo tanto la ausencia de pico endotérmico en la fracción ALB puede deberse a la presencia de débiles asociaciones puente hidrógeno o a la gran flexibilidad de la conformación terciaria de los polipéptidos como informaron Tang y Wang (2010) para ALB de trigo. En este sentido, Avanza y col. (2015) informaron valores bajos de ΔH (0,46-1,77 J/g) para la fracción ALB de dos variedades de *Vigna unguiculata* (caupí y cuarentón). La fracción GLB presentó un único pico endotérmico (Fig. IV.4a), con una T_d de $90,37 \pm 0,05$ °C y ΔH de $10,28 \pm 0,05$ J/g. Tanto T_d como ΔH se encuentran en el rango informado para otras globulinas de almacenamiento (Tang y Sun, 2011; Tang y Wang, 2010).

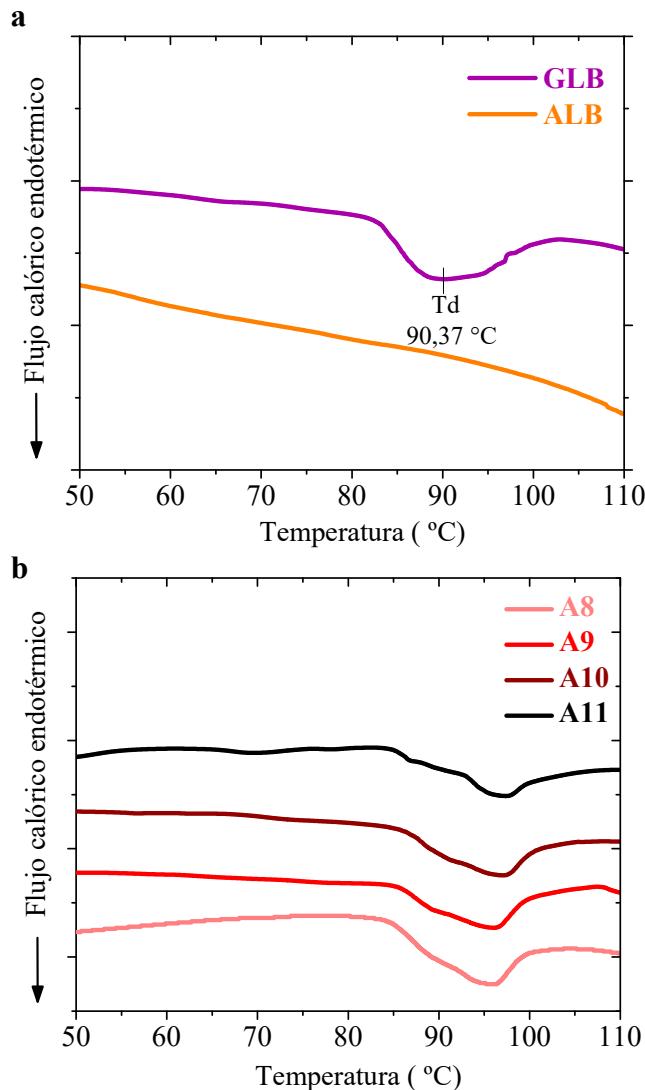


Figura IV.4: Termogramas de a) ALB y GLB y b) aislados proteicos de CC.

Los termogramas obtenidos para aislados proteicos de CC muestran un único pico endotérmico (Fig. IV.4b), al igual que lo informado por Mwasaru y col. (1999a) para CC y en coincidencia con el comportamiento de aislados proteicos de otras legumbres como garbanzos (Xu y col., 2017) y caupí (Peyrano y col., 2016). Los parámetros T_d y ΔH calculados se presentan en la Tabla IV.3. La T_d de los aislados proteicos de CC se incrementó con el aumento del pH hasta llegar a pH 10,0, resultando en aislados más estables al calor debido al efecto estabilizante de las sales, las cuales se formaron durante el proceso de extracción de las proteínas (Tabla IV.2). En este sentido, Zhang y col. (2010) informaron que la T_d de aislados proteicos de *Phaseolus vulgaris* (pH 8,0) aumentaba con el incremento de la fuerza iónica. Damodaran y Kinsella (1981) indicaron que a pesar de

Capítulo IV

que valores mayores de Td reflejan una resistencia a la desnaturización térmica, las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas estabilizadas podrían no ser las mismas que las presentes en las proteínas nativas, y pueden obtenerse menores valores de ΔH . Por otro lado, la ΔH de los aislados proteicos de CC disminuyó con el incremento del pH, esto indicaría que al aumentar el pH de extracción se produce cierta desnaturización de las proteínas aisladas. Sin embargo, la variación de ΔH encontrada en este trabajo es menor comparada con la observada en otras especies. Arntfield y Murray (1981) encontraron una disminución progresiva de ΔH en proteínas de *Vicia faba* con el aumento del pH de extracción (8,0-12,0), y Abugoch y col. (2010) informaron un disminución del 50% de ΔH para proteínas de *Amaranthus hypochondriacus* al aumentar el pH de extracción de 9,0 a 11,0. Los resultados encontrados para las proteínas de CC podrían explicarse teniendo en cuenta que al cambiar el pH de extracción se forman estructuras agregadas como se observó en las electroforesis (Fig. IV.2a y 2b), las cuales contribuirían a compensar parcialmente la pérdida de ΔH ocasionada por la desnaturización.

Tabla IV.3: Temperatura de desnaturización (Td) y variación en la entalpía de transición (ΔH) de aislados proteicos de CC.

	Td (°C)	ΔH (J/g)
A8	94,68 \pm 0,15c	13,03 \pm 0,23a
A9	95,91 \pm 0,12b	11,03 \pm 0,42b
A10	96,70 \pm 0,23a	11,29 \pm 0,45b
A11	96,36 \pm 0,05a	9,33 \pm 0,93c

Promedio \pm desvío estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Los aislados proteicos de CC obtenidos en este trabajo son más estables al calor (mayor Td y ΔH) que los obtenidos por Mwasaru y col. (1999a), probablemente debido a diferencias en la técnica de extracción de las proteínas. La completa desnaturización de las proteínas podría limitar sus propiedades tecnofuncionales (Arntfield y Murray, 1981) y afectar su digestibilidad, resultando menos beneficioso desde un punto de vista nutricional. Las proteínas con valores elevados de Td facilitan su uso como ingredientes alimenticios, ya que la aplicación de procesos térmicos no causaría mayores cambios en su estructura y por lo tanto en sus propiedades tecnofuncionales y nutricionales.

IV.3.3. Cromatografía rápida de proteínas en medio líquido (FPLC)

IV.3.3.1. Cromatografía de exclusión molecular (CEM)

La cromatografía de exclusión molecular permite analizar la composición molecular y caracterizar las especies presentes en las fracciones proteicas mayoritarias y en los aislados proteicos de CC, a partir de la separación de las proteínas por su tamaño (peso molecular). En la Figura IV.5 se presentan los perfiles cromatográficos por exclusión molecular de las fracciones ALB y GLB (Fig. IV.5a), junto con las electroforesis SDS-PAGE de los picos obtenidos (Fig. IV.5b y 5c).

1

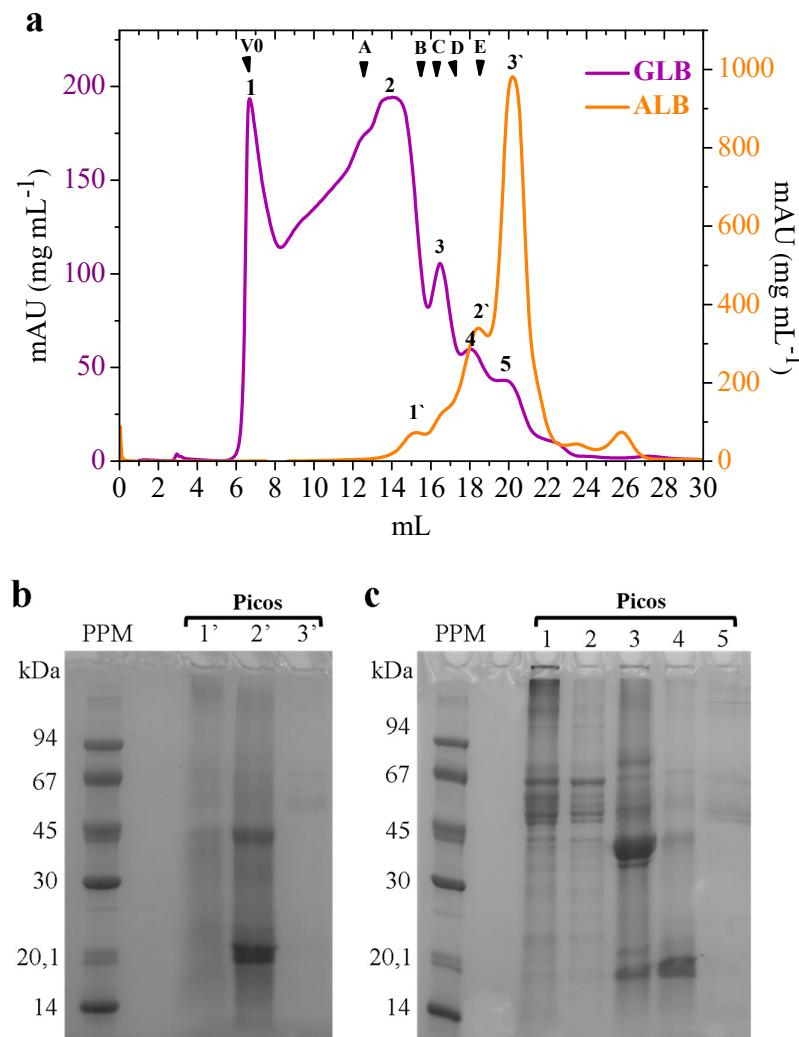


Figura IV.5: a) Cromatografía de exclusión molecular de ALB y GLB de CC ($V_0=7,1$ mL). Peso molecular de marcadores (A-E): 669 kDa (A), 150kDa (B), 67 kDa (C), 43 kDa (D) y 13,7 kDa (E). b) SDS-PAGE de ALB. c) SDS-PAGE de GLB. PPM: Patrón de peso molecular. Tinción: Coomassie blue.

Capítulo IV

En la fracción ALB (Fig. IV.5a, línea naranja) se observan tres picos principales (1', 2' y 3'), donde especies de PM \approx 135 kDa eluyeron en el pico 1', especies de PM \approx 60-19,5 kDa en el pico 2' y especies de PM $<$ 13,7 kDa en el pico 3'. La electroforesis (Fig. IV.5b) muestra bandas de polipéptidos poco definidas en el pico 1' mientras que en el pico 2' se observan polipéptidos de 45 y 20 kDa; los polipéptidos presentes en el pico 3' no se visualizan en la corrida electroforética y corresponderían a especies de bajo PM ($<$ 14 kDa).

La fracción GLB (Fig. IV.5a, línea violeta) se resolvió en cinco picos (1; 2; 3; 4; 5), donde las especies que eluyeron fueron de mayor PM que las encontradas en la fracción ALB. A partir del perfil cromatográfico, se observa que los agregados proteicos solubles eluyeron en el volumen muerto de la columna (V_0) (pico 1), las especies de PM \approx 250 kDa eluyeron en el pico 2, especies de PM \approx 63 kDa en el pico 3, especies de PM \approx 19,4 kDa en el pico 4 y las especies que eluyen en el pico 5 tendrían un PM $<$ 13,7 kDa. El perfil electroforético de los picos de GLB (Fig. IV.5c) revela la presencia de agregados solubles (PM $>$ 94 kDa) y principalmente de polipéptidos de vicilina 7S (picos 1 y 2), una banda de 40 kDa y una banda más débil de 20 kDa (pico 3), donde esta última es el componente principal del pico 4. Estas últimas bandas pueden corresponder a GLB de bajo peso molecular (Fig. IV.1a), o bien a una contaminación con la fracción ALB que se extrae en un paso anterior. Sathe y Venkatachalam (2007) reportaron al menos siete picos en el perfil cromatográfico de ALB de *Vigna aconitifolia* L, mientras que en el perfil de la fracción GLB obtuvieron dos picos principales con una composición similar de polipéptidos, además de cuatro picos de menor proporción. Avanza y col. (2015) informaron que la fracción GLB de *Vigna unguiculata* presentaba agregados proteicos de alto PM ($>$ 600 kDa), un pico principal correspondiente a GLB 11S (PM \approx 300 kDa) y tres picos minoritarios relacionados a la asociación molecular de los trímeros de vicilinas 7S (67-150 kDa).

Los perfiles cromatográficos de los aislados proteicos de CC resultaron similares entre sí (6 picos) con ligeras diferencias en la proporción de especies que eluyeron en el pico 1 de A11 con respecto a los demás aislados (Fig. IV.6a). Además, estos perfiles presentaron una mayor similitud con el de la fracción GLB (Fig. IV.5a, línea violeta) lo cual indica que GLB es el componente principal de los aislados proteicos.

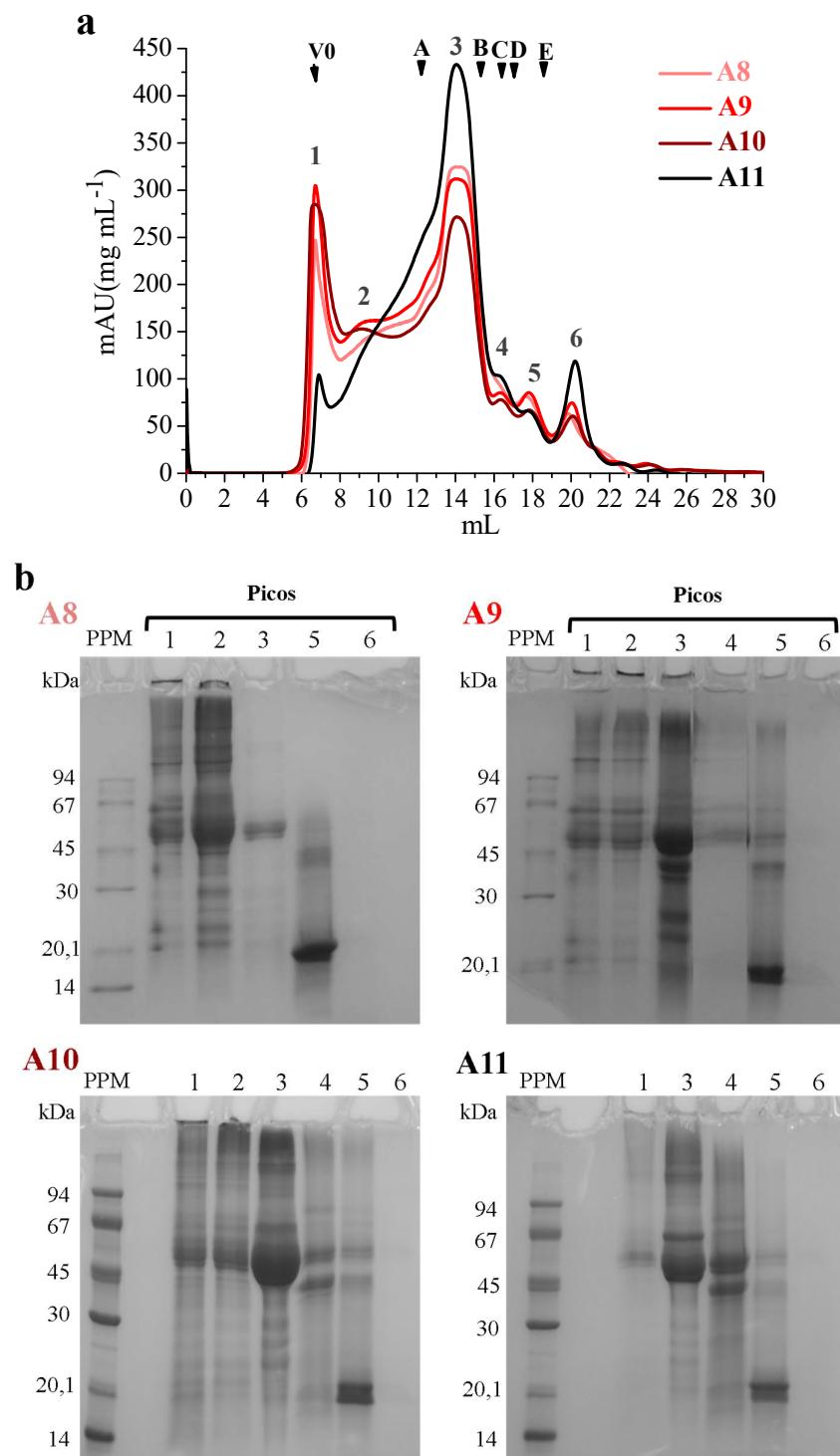


Figura IV.6: a) Cromatografía de exclusión molecular de aislados proteicos de CC ($V_0=7,1$ mL). Peso molecular de marcadores (A-E): 669 kDa (A), 150 kDa (B), 67 kDa (C), 43 kDa (D) y 13,7 kDa (E); b) SDS-PAGE de los picos cromatográficos de aislados proteicos de CC. PPM: Patrón de peso molecular. Tinción: Coomassie blue.

Capítulo IV

En los perfiles electroforéticos (Fig. IV.6b) se observan agregados proteicos (PM >94 kDa) en el pico 1 (V_0) de A8, A9 y A10, pero no en A11. Los picos 2 y 3 en A8, A9 y A10 no se encuentran bien definidos, uniéndose en un solo pico en A11, lo cual se evidencia en la similitud del perfil electroforético obtenido para estos picos, donde se visualizan las bandas correspondientes a vicilina 7S. El pico 4 (ausente en A8) presenta polipéptidos de 45 y 20 kDa, los cuales también forman parte del pico 5. Estos polipéptidos pueden corresponder a las especies de menor PM de GLB (Fig. IV.5c), o bien a las correspondientes a ALB (Fig. IV.5b). Shevkani y col. (2015) informaron cuatro picos en los perfiles cromatográficos de aislados de *Phaseolus vulgaris*, con presencia de agregados proteicos que eluyeron en el V_0 de la columna y especies que indican a la fracción vicilina como el componente principal.

Como lo mencionamos anteriormente, A11 presenta el mayor porcentaje de desnaturalización con respecto a los demás aislados, lo cual facilita la exposición de regiones que estaban ocultas en la proteína nativa favoreciendo así la formación de agregados, como se puede ver en las Figuras IV.2c y 2d. A pH 11,0 se observa una disminución en la proporción de especies que eluyeron en el pico 1, tal vez debido a que los agregados proteicos formados son menos solubles en las condiciones usadas en CEM (*buffer* A, pH=8,0, $\mu=0,3$). Resultados similares fueron informados por Abugoch y col. (2008) para proteínas de quinoa y por Gao y col. (2020) para aislados proteicos de arvejas. Gao y col. (2020) informaron que el aumento del pH de extracción (8,5, 9,0 y 9,5) promovió la formación de agregados proteicos, y la consecuente disminución de la solubilidad proteica.

IV.3.3.2. Cromatografía de intercambio iónico (CII)

Las proteínas poseen numerosos grupos funcionales que pueden tener tanto carga positiva como negativa. La cromatografía de intercambio iónico (CII) permite separar proteínas de acuerdo con su carga neta, la cual depende de la composición de la fase móvil; variando el pH o la fuerza iónica de la fase móvil se puede lograr la separación de las especies proteicas que componen las distintas muestras analizadas.

En la Figura IV.7a y 7b se presentan los perfiles cromatográficos de intercambio iónico de fracciones de CC, junto con las electroforesis de los picos (Fig. IV.7c y 7d). Tanto en la fracción ALB (Fig. IV.7a) como en la fracción GLB (Fig. IV.7b) se encuentran polipéptidos que no fueron retenidos por la columna (pico 1), los cuales corresponderían a los polipéptidos denominados básicos encontrados en la electroforesis 2D (Fig. IV.3a y

3b). Los polipéptidos retenidos en ambas fracciones se resolvieron en seis picos, de los cuales en el caso de la fracción ALB (Fig. IV.7a) los tres picos principales (3; 4 y 5) eluyeron a una concentración de NaCl comprendida entre 0,21 M y 0,27 M, mientras que los picos principales de GLB (Fig. IV.7b) eluyeron a concentraciones mayores de NaCl [0,45M (pico 6) y 0,62 M (pico 7)], lo cual está relacionado a un mayor carácter acídico de estos polipéptidos. Esto último concuerda con lo observado en la electroforesis bidimensional (Fig. IV.3a y 3b), donde el pI de los polipéptidos presentes en la fracción ALB fue mayor a los de la fracción GLB. Además, los picos de ALB resultaron más angostos que los obtenidos para GLB, lo que indicaría que en esta última fracción es mayor la heterogeneidad de carga de las proteínas.

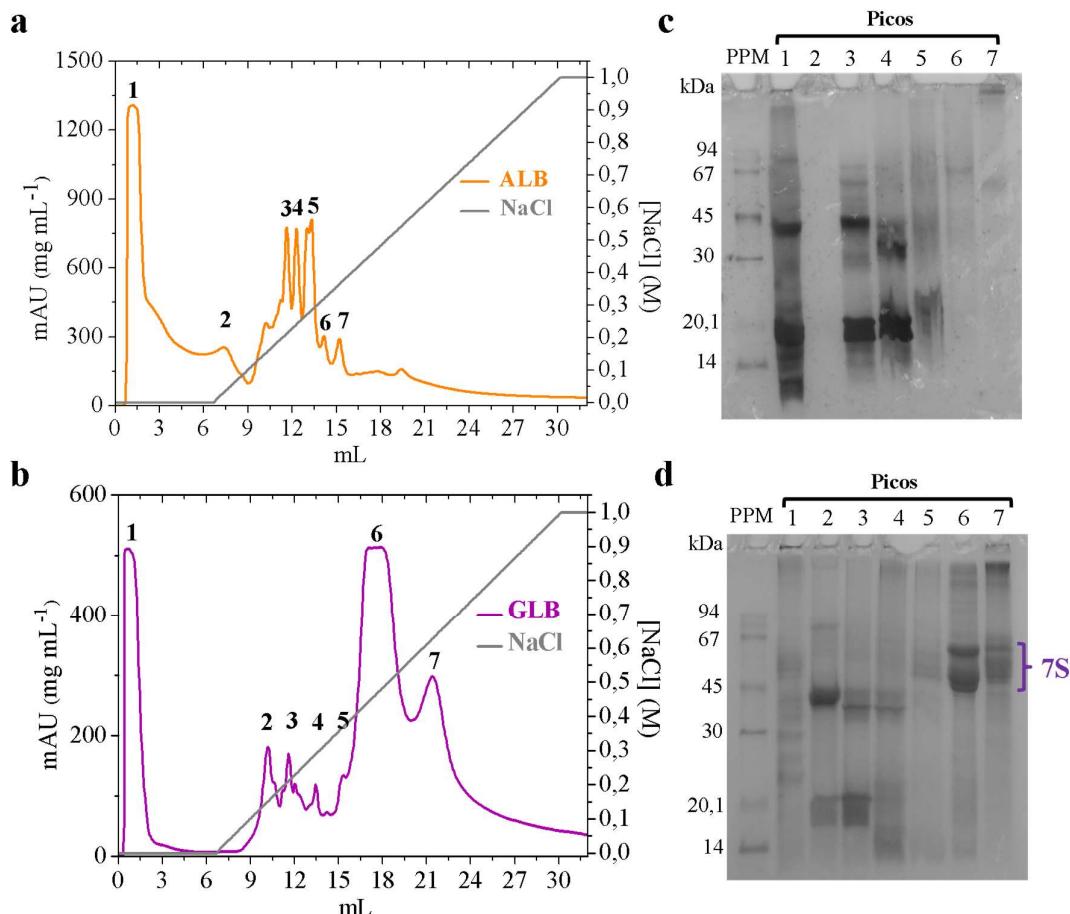


Figura IV.7: Cromatografía de intercambio iónico (CII) de ALB y GLB de CC (*Buffer B*, pH 8,0). Con línea gris se marca el gradiente empleado de NaCl. **a)** CII de ALB, **b)** CII de GLB, **c)** SDS-PAGE de ALB, **d)** SDS-PAGE de GLB. PPM: Patrón de peso molecular. Tinción: Nitrato de plata (ALB), Coomassie blue (GLB).

Capítulo IV

Las electroforesis de los picos de la fracción ALB (Fig. IV.7c) y de la fracción GLB (Fig. IV.7d) revelan las bandas características de cada fracción (Fig. IV.1a), encontrándose las bandas correspondientes a la fracción vicilina 7S en los picos 6 y 7 de GLB.

Los aislados proteicos de CC presentaron perfiles similares de CII (Fig. IV.8a) y se resolvieron en ocho picos, con algunas pequeñas diferencias entre ellos.

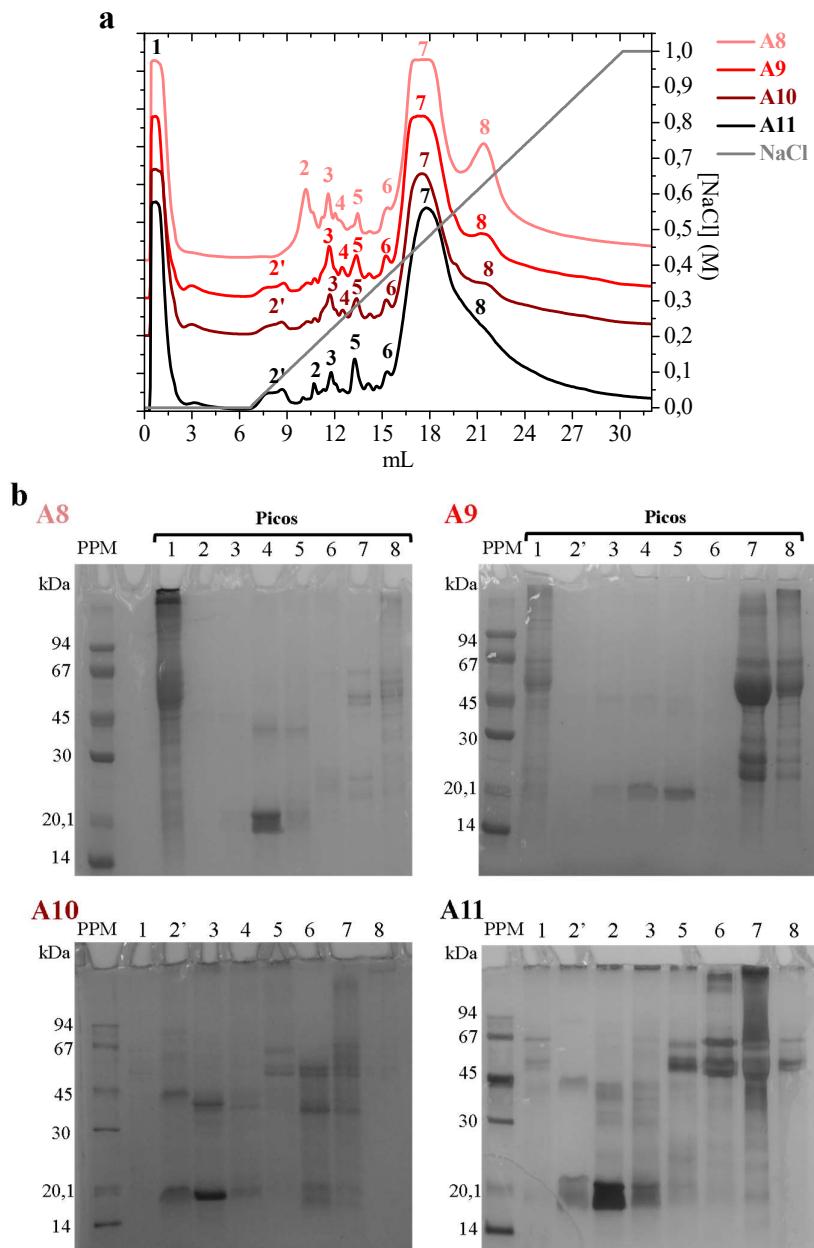


Figura IV.8: a) Cromatografía de intercambio iónico (CII) de aislados proteicos de CC (*Buffer B*, pH 8,0). Con línea gris se marca el gradiente empleado de NaCl, b) SDS-PAGE de los picos cromatográficos de aislados proteicos de CC. PPM: Patrón de peso molecular. Tinción: Coomassie blue (A8, A9 y A10), Nitrato de plata (A11).

En A8 se encuentran especies que eluyen a la concentración de 0,15 M de NaCl (pico 2) y no se encuentra en los demás aislados, mientras que en A9, A10 y A11 se distingue el pico 2' que eluye a menores concentraciones de NaCl que en A8. El pico 8 (0,62 M de NaCl) disminuye progresivamente con el aumento del pH de extracción, encontrándose en A11 una baja resolución entre los picos 7 y 8. Al igual que ocurre en CEM, los perfiles cromatográficos de los aislados resultaron con características similares al de la fracción GLB (Fig. IV.7b), siendo los picos principales el 7 y 8, que eluyeron entre 0,45-0,47 M y 0,62 M de NaCl, respectivamente.

Por otro lado, el análisis por SDS-PAGE de cada pico de A8 y A9 (Fig. IV.8b) revela que ambos tienen la misma composición polipeptídica en cada pico. En los picos que eluyen a bajas concentraciones de NaCl se encuentran polipéptidos de bajo PM (<45 kDa) mientras que en los picos 7 y 8 aparecen las bandas características de vicilinas 7S, aunque en el pico 1 (proteínas no retenidas por la columna) se distinguen estas mismas bandas. En A10 y A11 (Fig. IV.8b), las bandas de vicilina 7S comienzan a visualizarse en el pico 5 (eluye a 0,30 M de NaCl) y continúan observándose hasta el pico 8.

Los resultados encontrados llevan a pensar que existen algunas diferencias estructurales entre los polipéptidos que componen cada aislado, lo que se expresa en la exposición de cargas distintas, o bien los agregados formados por el incremento del pH de extracción (Fig. IV.2a) dan lugar a una diferencia en las cargas superficiales que presentan.

IV.3.4. Espectroscopia infrarroja

El espectro de absorción IR de proteínas se caracteriza por la presencia de bandas entre 1800 y 1400 cm^{-1} ; ya que en este rango se encuentra la banda amida I (vibración o estiramiento del enlace C=O acoplado al aleteo del H) centrada en 1650 cm^{-1} . La sensibilidad de la banda amida I a cambios conformacionales hace posible estudiar no solo la desnaturalización o renaturalización de las proteínas sino también los procesos de agregación (Carbonaro y col., 2012). En la banda amida I predominan las conformaciones hoja plegada β (1620-1640 cm^{-1}), estructura desordenada (1640-1650 cm^{-1}), α -hélice (1650-1660 cm^{-1}) y giros- β (1660-1680 cm^{-1}) (Fabian y Mäntele, 2006; Kong y Yu, 2007). Además, se observan hebras β en estructuras agregadas (1618 cm^{-1} y 1685 cm^{-1}) (Achouri y col., 2012; Fabian y Mäntele, 2006).

Los espectros de absorción IR de las fracciones proteicas ALB y GLB y de aislados proteicos de CC (Fig. IV.9a y 9b) presentaron las bandas características de proteínas. En la fracción ALB las bandas amida I y II se encuentran solapadas, lo cual no se observa en la

fracción GLB. Además, el pico máximo de la banda amida I se encuentra en $1620,7\text{ cm}^{-1}$ para la fracción ALB y en $1639,7\text{ cm}^{-1}$ para la fracción GLB, lo cual indica que en la fracción ALB predominarían conformaciones como hoja plegada β y hebras β en estructuras agregadas mientras que en la fracción GLB predominarían no solo estructuras ordenadas como hoja plegada β sino también estructuras desordenadas.

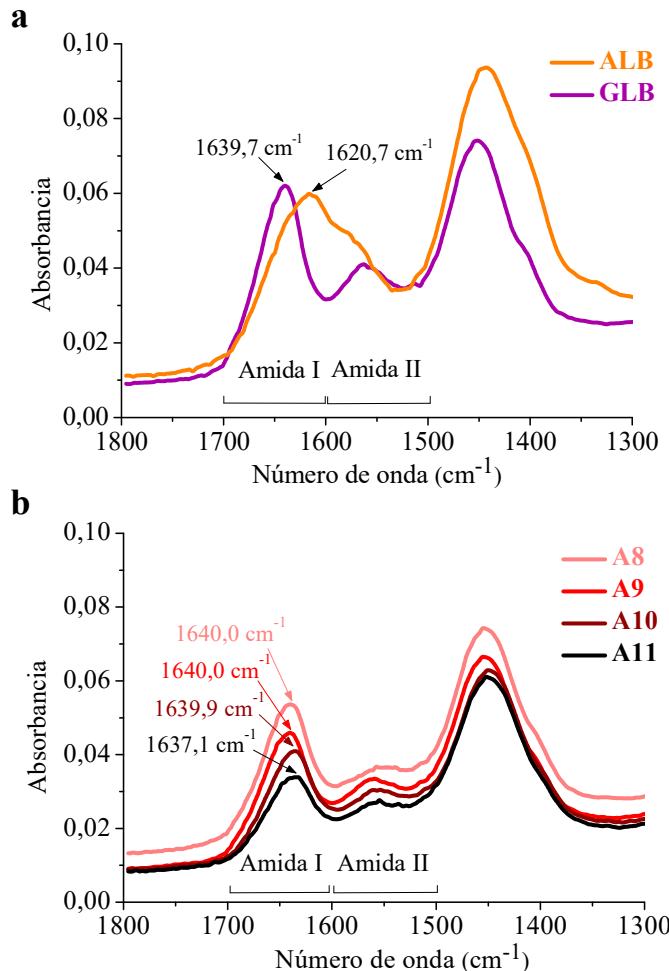


Figura IV.9: Espectros de absorción FTIR entre $1800\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$. **a)** ALB y GLB de CC, **b)** Aislados proteicos de CC.

El pico máximo de la banda amida I en los aislados proteicos se encontró alrededor de 1640 cm^{-1} , similar a la fracción GLB. En cambio, en A11 ocurrió un ligero desplazamiento del máximo del pico encontrándose en $1637,1\text{ cm}^{-1}$.

A partir de la deconvolución de los espectros infrarrojos se obtuvieron los porcentajes de cada estructura, teniendo en cuenta que al utilizar D_2O como solvente, el ^1H de la unión peptídica es reemplazado por el ^2H y la banda amida I sufre un pequeño

desplazamiento (Montich y col., 2013). Los porcentajes de cada estructura se presentan en la Tabla IV.4.

Tabla IV.4: Composición de la estructura secundaria de ALB, GLB y aislados proteicos de CC.

	Composición de la estructura secundaria (%)				
	α -hélice	Hoja plegada β	Giros- β	Estructura desordenada	Hebras β en estructuras agregadas
ALB	10,84 ± 1,19c	41,57 ± 0,09a	16,18 ± 0,68b	12,17 ± 1,29d	15,56 ± 1,92a
GLB	13,71 ± 1,06bc	37,34 ± 6,50ab	17,88 ± 0,32ab	18,20 ± 1,20cd	7,87 ± 2,69b
A8	22,36 ± 2,21a	31,67 ± 1,41bc	9,35 ± 1,68c	29,74 ± 4,44ab	ND
A9	14,18 ± 0,71bc	27,49 ± 2,16cd	18,29 ± 0,03ab	31,95 ± 2,95a	8,08 ± 0,02b
A10	16,25 ± 3,43b	21,21 ± 0,95d	19,84 ± 2,14a	24,66 ± 4,41bc	8,96 ± 0,80b
A11	13,63 ± 3,00bc	28,60 ± 1,80c	18,69 ± 0,1ab	31,25 ± 1,06ab	5,50 ± 2,01b

Promedio ± desvío estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05). ND: No detectado.

Las fracciones ALB y GLB presentaron mayor proporción de hoja plegada β que de α -hélice, lo cual concuerda con Mawal y col. (1990), quienes estudiaron vicilinas de CC por dicroísmo circular. Del mismo modo, Carbonaro y col. (2008) y Law y col. (2008) informaron porcentajes similares para GLB 7S de *Phaseolus vulgaris* y Concanavalina A de *Canavalia ensiformis* y así como de *Dolichos lablab* y *Phaseolus calcaratus*. Un porcentaje similar de hoja plegada β (37,2%) pero un mayor porcentaje de α -hélice y giros- β (24,6% y 38,21%, respectivamente) fue informado por Li y col. (2018) para albúmina de maní. Por otro lado, la fracción ALB presentó una mayor proporción (p<0,05) de hebras β en estructuras agregadas que la fracción GLB.

Los aislados A9, A10 y A11 presentaron una proporción similar de hoja plegada β , estructuras desordenadas y α -hélice. A8 difiere de los demás aislados por presentar una mayor proporción de α -hélice (22,36%), una menor proporción de giros- β (9,35%) y ausencia de hebras β en estructuras agregadas. Además, A10 tiene una menor proporción de hoja plegada β que A8 y A11. La proporción de hoja plegada β es menor y la proporción de estructuras desordenadas es mayor para los aislados proteicos que lo encontrado para las fracciones ALB y GLB, probablemente debido a la desnaturalización parcial de las proteínas durante el proceso de extracción. Nuestros resultados concuerdan

Capítulo IV

con lo informado por diversos autores para proteínas de legumbres, como por ejemplo aislado comercial de arvejas (Beck y col., 2017) y concentrados proteicos de lenteja (mayor proporción de hoja plegada β que α -hélice) (Jarpa-Parra y col., 2014). Gómez y col. (2021) informaron una disminución en el porcentaje de hoja plegada β junto con un aumento de giros- β con el aumento del pH de extracción de 8,0 a 10,0 en aislados proteicos de caupí.

La estructura y conformación de las proteínas vegetales de almacenamiento, como las vicilinas 7S, limitan la digestión de estas proteínas durante su paso por el tracto gastrointestinal (Carbonaro y col., 2000). Se ha encontrado que la proporción de hoja plegada β y hebras β en estructuras agregadas tiene un rol importante en la disminución de la digestibilidad proteica. En este sentido, Sun y col. (2020) informaron que una disminución de hoja plegada β y/o un aumento de estructuras desordenadas contribuiría a incrementar la digestibilidad de las proteínas de CC. Considerando que las fracciones ALB y GLB presentan igual proporción de hoja plegada β , la fracción ALB podría ser menos digerible que la fracción GLB debido a que posee mayor proporción de hebras β en estructuras agregadas (Carbonaro y col., 2012). Además, se ha encontrado que la fracción ALB es ligeramente más resistente a la digestión enzimática por su mayor contenido en aminoácidos azufrados (Carbonaro y col., 2015). Rubio y col. (2013) y Sathe y col. (2007) informaron mayor resistencia a la digestión para la fracción ALB que para la fracción GLB de *Pisum sativum* y de *Vigna aconitifolia*, respectivamente. Con respecto a los aislados proteicos, podría pensarse que debido a la ausencia de hebras β en estructuras agregadas en A8 y la menor proporción de hoja plegada β en A10, ambos aislados podrían tener mayor digestibilidad que los demás.

IV.3.5. Fluorescencia intrínseca

Los residuos de triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe) son los fluoróforos intrínsecos de las proteínas, donde los primeros son los de mayor rendimiento cuántico y su espectro de emisión responde a la polaridad de su entorno (Lakowitz, 2006). El corrimiento del máximo de emisión ($\lambda_{\text{máx}}$) hacia el rojo ocurre cuando el microambiente que rodea a los residuos de Trp cambia de no polar a polar y la exposición de estos residuos al solvente es mayor (Chatterjee y Mandal, 2003).

En la Figura IV.10a y 10b se presentan los espectros de fluorescencia intrínseca de las fracciones ALB, GLB y aislados proteicos de CC.

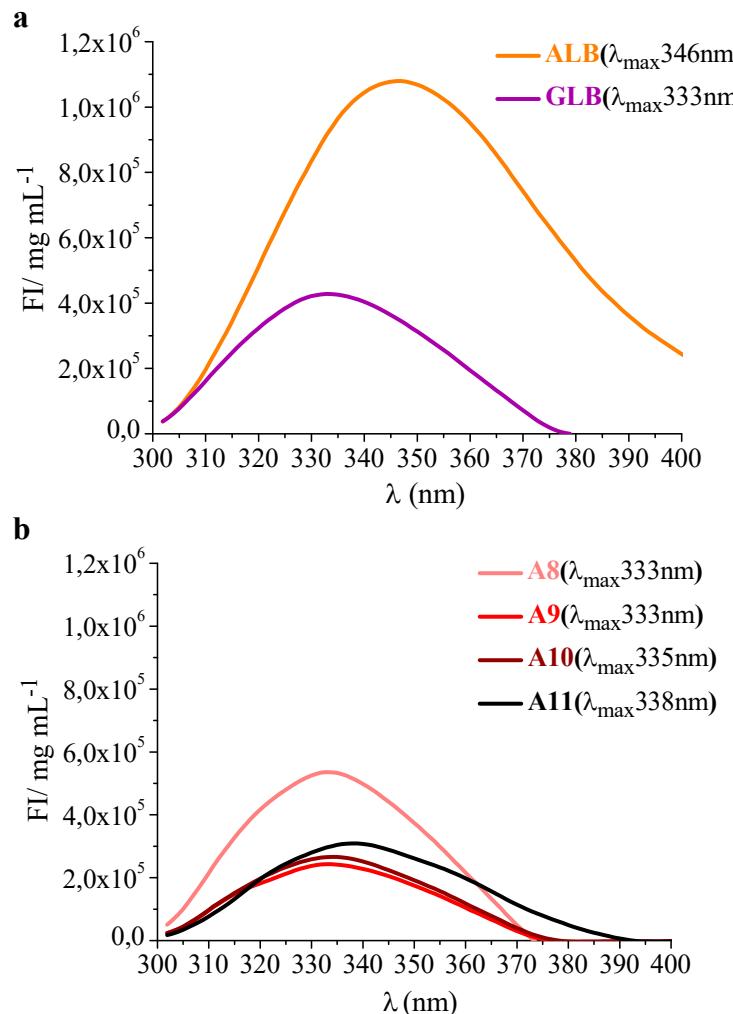


Figura IV.10: Espectros de fluorescencia intrínseca (FI/mg/mL) de a) ALB y GLB, b) aislados proteicos de CC.

La fracción ALB presentó un $\lambda_{\text{máx}}$ a 346 nm y una mayor intensidad de fluorescencia intrínseca (FI) que la fracción GLB cuya $\lambda_{\text{máx}}$ fue de 333 nm (Fig. IV.10a). Estos resultados sugieren que los residuos de Trp en la fracción ALB estarían expuestos a un ambiente más hidrofilico, por ejemplo, más cercano a la superficie (Quiroga y col. 2009) y que la fracción GLB presentaría una estructura terciaria más compacta. Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los informados para caupí, amaranto y frijoles (del género *Phaseolus*) (Avanza y col., 2015; Gorinstein y col., 2001; Tang y Sun, 2011).

El incremento del pH en la extracción de los aislados proteicos indujo un desplazamiento hacia el rojo del $\lambda_{\text{máx}}$ debido al aumento del grado de desnaturalización de las proteínas (Fig. IV.10b) con una mayor exposición de los residuos aromáticos a un

Capítulo IV

ambiente más polar (Chatterjee y Mandal, 2003). La FI fue mayor en A8 con respecto a los demás aislados y su disminución al aumentar el pH de extracción puede deberse a un aumento en la distancia de los residuos de Tyr y Trp como consecuencia de la desnaturalización durante el proceso de extracción (Goristein y col., 2001), o también debido a la presencia de puentes disulfuro en los agregados proteicos (Fig. IV.2a y 2b) que actúan como *quenchers* (Peyrano y col., 2016). Gao y col. (2020) encontraron que a medida que aumentaba el pH de extracción para aislados proteicos de arveja, el contenido de grupos SH total y SS aumentaba mientras que disminuía la exposición de SH libres. Yin y col. (2011) informaron que aislados proteicos de *Phaseolus vulgaris* (pH 8,0) mostraron un $\lambda_{\text{máx}}$ cercano al obtenido en este trabajo, lo cual es característico de residuos de Trp rodeados por un ambiente relativamente hidrofóbico.

IV.3.5.1. Desnaturalización con urea

La estabilidad conformacional de las fracciones ALB y GLB fue estudiada frente a la acción de un agente desnaturizante, en este caso urea, donde los mecanismos propuestos sugieren que la urea tiene la capacidad de interrumpir las uniones puente hidrógeno intramoleculares y competir por las uniones con el agua ligada en el interior de las moléculas (Badui Dergal, 2013; Stumpe y Grubmu, 2007).

Las fracciones proteicas ALB y GLB se sometieron a una desnaturalización progresiva frente a urea y se obtuvieron los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca para cada concentración. En la Figura IV.11a y 11b se muestran algunos espectros de fluorescencia de las fracciones ALB y GLB expuestas a distintas concentraciones de urea. De acuerdo con la desnaturalización de las proteínas, las fracciones ALB y GLB presentaron un corrimiento hacia el rojo de $\lambda_{\text{máx}}$ frente a concentraciones de urea entre 2-8 M. Este hecho indica una progresiva desnaturalización y exposición de residuos de Trp en la superficie de las proteínas (Quiroga y col., 2009).

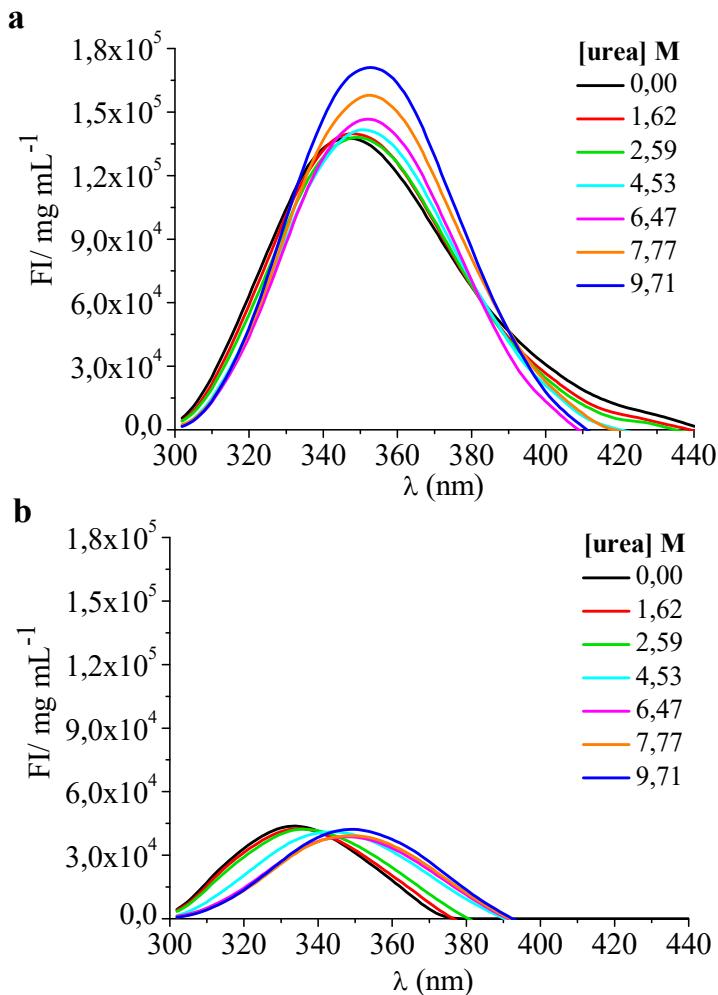


Figura IV.11: Espectros de fluorescencia intrínseca de **a)** ALB y **b)** GLB a distintas concentraciones de urea.

En la fracción ALB se observó un incremento de la FI lo cual coincide con lo sugerido por Chatterjee y Mandal (2003) en que la intensidad de FI puede aumentar o disminuir durante este proceso de desnaturación. Yin y col. (2011) observaron un comportamiento similar en aislados proteicos de *Phaseolus vulgaris* tratados con concentraciones urea $\geq 1,5$ M.

En la Figura IV.12 se presentan las curvas de desnaturación ($\lambda_{\text{máx}}$ vs. concentración de urea) de las fracciones ALB y GLB, y se observa un comportamiento diferente entre ambas fracciones.

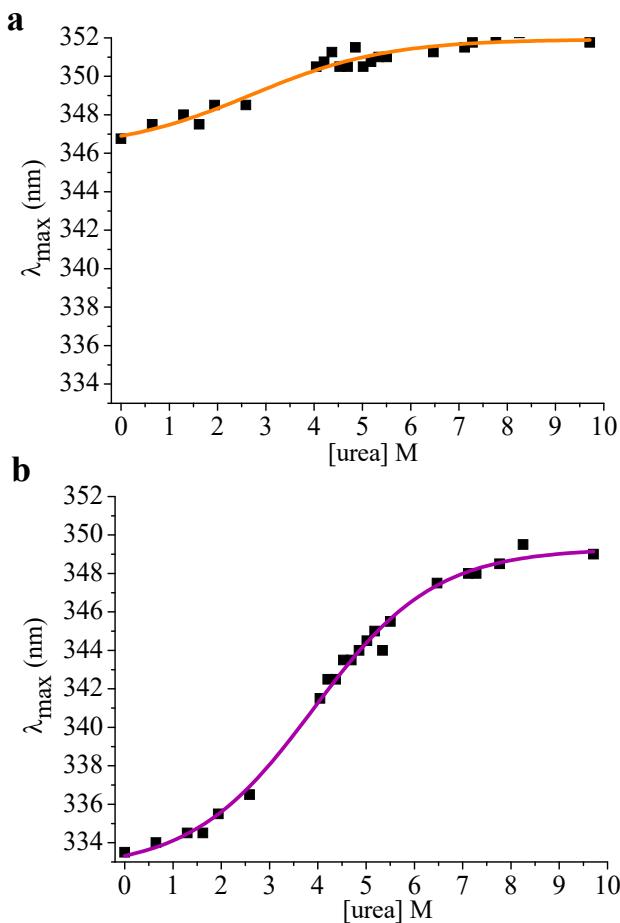


Figura IV.12: Curvas de desnaturación con urea, a) ALB y b) GLB. La línea continua muestra la curva de ajuste de los puntos experimentales.

A partir de las curvas de ajuste de los datos experimentales, se obtuvieron los parámetros de estabilidad de las fracciones proteicas, la concentración molar de urea cuando la proteína está 50% desnaturizada (U_{50}), la relación entre las concentraciones de urea cuando la proteína está 80% y 20% desnaturizada (U_{80}/U_{20}), la cual brinda información respecto de la cooperatividad del proceso de desnaturación, y finalmente la estabilidad conformacional de las proteínas estudiadas ($\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}$). Los resultados se presentan en la Tabla IV.5.

Tabla IV.5: Parámetros de estabilidad de ALB y GLB.

	U_{50} (M)	U_{80}/U_{20}	$\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}$ (kcal/mol)
ALB	$3,15 \pm 0,01\text{b}$	$5,27 \pm 0,02\text{a}$	$1,32 \pm 0,10\text{b}$
GLB	$3,87 \pm 0,02\text{a}$	$2,85 \pm 0,09\text{b}$	$2,37 \pm 0,10\text{a}$

Promedio \pm desvío estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

El valor de U_{50} fue mayor para la fracción GLB que para la fracción ALB, es decir que se necesita mayor concentración de urea para alcanzar el 50% de estructuras desnaturalizadas. El valor de U_{80}/U_{20} de la fracción GLB fue menor que el obtenido para la fracción ALB, lo cual significa que el proceso de desnaturalización es más cooperativo para la fracción GLB que para la fracción ALB (es decir, segmentos de proteínas desnaturalizados por acción de urea cooperan entre sí para la desnaturalización de la proteína). Además, la energía libre de desnaturalización (ΔG_{H2O}) para GLB sugiere que esta fracción tiene mayor estabilidad conformacional que ALB. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en DSC y fluorescencia intrínseca, sugiriendo que GLB tiene una estructura menos flexible y más compacta que ALB. Los resultados hallados para GLB son similares a los informados por Quiroga y col. (2009), quienes estudiaron el comportamiento de globulinas de amaranto frente a urea e informaron valores de U_{50} cercano a 3 M y ΔG_{H2O} entre 2,2-3,1 kcal/mol. Chatterjee y Mandal (2003) hallaron valores superiores para ΔG_{H2O} (4,4 kcal/mol) al estudiar la desnaturalización con urea de monómeros de Concanavalina A de *Canavalia ensiformis*.

Aunque la conformación nativa es esencial para asegurar el correcto desempeño de la función asociada a una proteína, la estabilidad conformacional de las fracciones proteicas de CC es notablemente baja. El estado nativo de la mayoría de las proteínas es solo alrededor de 5-15 kcal/mol más estable que sus conformaciones desplegadas (Shirley, 1995).

IV.3.6. Hidrofobicidad Superficial

La hidrofobicidad superficial (H_o) es una propiedad estructural de las proteínas que se relaciona con sus propiedades tecnofuncionales (solubilidad, propiedades emulsificantes y espumantes), su biodisponibilidad y calidad nutricional. En general, la concentración de aminoácidos hidrofóbicos es elevada en proteínas de legumbres, y su presencia en la superficie también, sobre todo en comparación con proteínas animales. Esto juega un papel importante en la estabilidad de las proteínas y puede disminuir su susceptibilidad a la proteólisis (Carbonaro y col., 2015).

En la Tabla IV.6 se presentan los resultados de H_o para las fracciones y aislados proteicos de CC. La fracción ALB presentó valores menores de H_o que la fracción GLB, lo cual concuerda con lo informado por Avanza y col. (2015) para dos variedades de *Vigna unguiculata* y por Makeri y col. (2017) para *Glycine max* (soja) y *Psophocarpus tetragonolobus* (frijol alado). La H_o del aislado A11 fue mayor sólo en un 10% respecto de

Capítulo IV

de A8, aún a pesar de la mayor exposición de residuos de Trp al solvente como se evidenció en los resultados de FI (Fig. IV.10b). La Ho de los aislados A9 y A10 resultó menor.

Tabla IV.6: Hidrofobicidad superficial (Ho FI/mg/mL proteína) de ALB, GLB y aislados proteicos de CC.

	Ho
ALB	1843 ± 77d
GLB	2600 ± 110a
A8	2377 ± 109b
A9	2138 ± 20c
A10	2122 ± 103c
A11	2622 ± 26a

Promedio ± desvío estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

Los valores de Ho obtenidos dependen de factores tanto metodológicos (por ejemplo, tipo de sonda) como aquellos propios de la estructura de las proteínas estudiadas, que deben ser considerados. Por un lado, debe tenerse en cuenta que la sonda utilizada en este trabajo (ANS) interacciona preferentemente con residuos hidrofóbicos de naturaleza aromática, sumado a la presencia de un parche hidrofóbico de varios residuos cercanos entre sí. Por otro lado, la presencia de residuos hidrofóbicos dentro de los agregados proteicos puede impedir la interacción entre el ANS y las regiones hidrofóbicas. Si bien es esperable un aumento de la Ho con la desnaturalización de las proteínas (Tabla IV.3), es importante considerar que la misma puede estar seguida de agregación proteica mediante interacciones hidrofóbicas o interacciones puente S-S. Estas interacciones pueden llevar a una disminución en la Ho o bien a un leve incremento (Alizadeh-Pasdar y Li-Chan, 2000), como ocurre en A11. Mwasaru y col. (1999a) informaron que la Ho de aislados proteicos de CC aumentaba con el incremento del pH de extracción, hasta pH 10,5 y luego disminuía. Es importante destacar que los valores de Ho informados por Mwasaru y col. (1999a) fueron obtenidos mediante el uso de una sonda diferente a la utilizada en este trabajo (ácido *cis*-parinárico, sonda aniónica alifática); por lo cual los sitios de unión son diferentes y por lo tanto los resultados no son comparables. Por otro lado, Peyrano y col. (2016) informaron para aislados proteicos de caupí un aumento del 50% en los valores de Ho cuando el pH de extracción se incrementó de pH 8,0 a pH 10,0.

IV.3.7. Solubilidad

La solubilidad proteica (So) es un criterio importante para el uso de proteínas de semillas en matrices alimentarias. El conocimiento de las características de solubilidad, en distintas condiciones, es muy útil para la selección de condiciones óptimas de extracción de las proteínas, además de ser un buen parámetro para sus potenciales aplicaciones (Pilosof, 2000a). En este trabajo se determinó la solubilidad de fracciones y aislados proteicos de CC en agua y en los solventes utilizados en las determinaciones anteriormente analizadas, además de su solubilidad a distinto pH.

IV.3.7.1. En distintos solventes

La fracción ALB presentó una So similar en agua destilada, *buffer A* y *buffer B*, mientras que la fracción GLB exhibió una mayor So en *buffer A* y una baja So en agua destilada, lo cual era esperable dada la naturaleza de cada una de estas fracciones (Tabla IV.7). La mayor So de la fracción GLB en *buffer A* es un punto a favor para el uso de estas proteínas como ingrediente alimentario. Avanza y col. (2015) y Tang y Wang (2010) reportaron valores similares de So en agua destilada para las fracciones ALB y GLB de caupí y de trigo, respectivamente.

Tabla IV.7: Solubilidad de ALB, GLB y aislados proteicos de CC en distintos solventes

	Agua destilada	Buffer A	Buffer B
ALB	71,10 ± 1,97ab	73,78 ± 1,35b	72,45 ± 0,98a
GLB	21,19 ± 2,74d	81,90 ± 1,75a	58,09 ± 3,16b
A8	70,08 ± 2,99b	55,1 ± 1,94d	44,03 ± 1,03de
A9	68,87 ± 2,19b	54,53 ± 1,09d	45,89 ± 4,22cd
A10	74,45 ± 2,12a	65,64 ± 3,93c	50,06 ± 2,89c
A11	59,93 ± 2,73c	38,57 ± 0,67e	38,89 ± 3,61e

Promedio ± desvío estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05). *Buffer A*: Na₂HPO₄ 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 8,0; *Buffer B*: Tris HCl 0,02 M, pH 8,0.

La So de aislados proteicos de CC presenta valores intermedios entre ambas fracciones proteicas. Como se mencionó anteriormente, la formación de agregados proteicos en los aislados obtenidos a distinto pH cambia la So de las proteínas que los componen. La So de los aislados proteicos de CC presentó valores entre 60-75% en agua destilada, superior a lo encontrado en *buffer A* y en *buffer B* (Tabla IV.7). La menor So en

el *buffer* A respecto a la So en agua destilada puede deberse a un efecto de *salting out*, por la presencia de sales que componen este *buffer* ($\mu=0,30$).

Por otro lado, A10 fue el aislado más soluble en todos los solventes estudiados mientras que A11 fue el menos soluble lo cual podría estar relacionado a la mayor Ho de A11 (Tabla IV.6), que favorece la formación de agregados insolubles. Este hecho está en concordancia con los resultados encontrados en CEM, donde se observó una disminución de los agregados solubles a este pH de extracción (Fig. IV.6). La So de aislados proteicos de CC en agua es similar a lo encontrado por Acevedo y col. (2017) para harina de CC, pero menor a lo obtenido por Peyrano y col. (2016) para aislados proteicos de caupí (91-93%).

IV.3.7.2. Solubilidad en función del pH

Se determinó la So de las fracciones y de aislados proteicos de CC en función del pH. En la Figura IV.13 se observa el perfil de So de las fracciones ALB y GLB, el cual presenta la forma de U característica de proteínas vegetales, con un mínimo de So a pH cercanos al pI de estas proteínas (Barac y col., 2015). La variación de So de la fracción ALB en función del pH fue menor con respecto a la fracción GLB. El mínimo de So de la fracción ALB fue de 44,1% y de la fracción GLB 8,1%. Estos resultados son similares a los encontrados en la bibliografía para fracciones proteicas de caupí, soja, frijol alado, alubia y trigo (Avanza y col., 2015; Makeri y col., 2017; Mundi y Aluko, 2012; Tang y Wang, 2010).

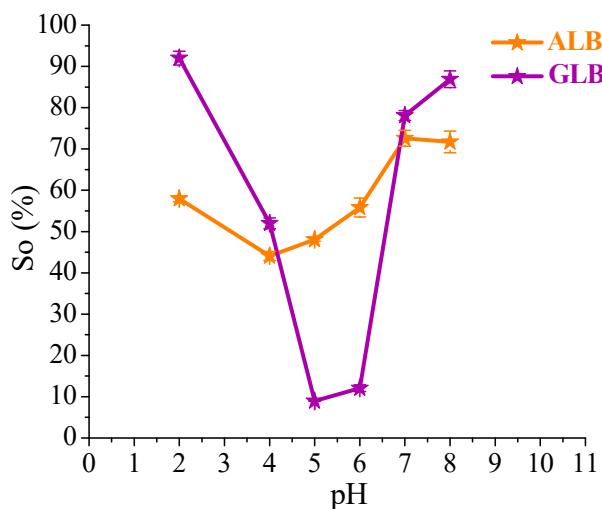


Figura IV.13: Solubilidad (So) de ALB y GLB de CC en función del pH.

En la Figura IV.14 se observa el perfil de So en función del pH para los aislados proteicos de CC, resultando en un comportamiento similar a la fracción GLB, con ligeras diferencias entre los distintos aislados proteicos. La mayor So se obtuvo a pH extremos (80-100%). A pH > 6, A9 presentó los menores valores de So mientras que a pH 2,0 y 10,0, el aislado proteico más soluble fue A10 (So≈100%).

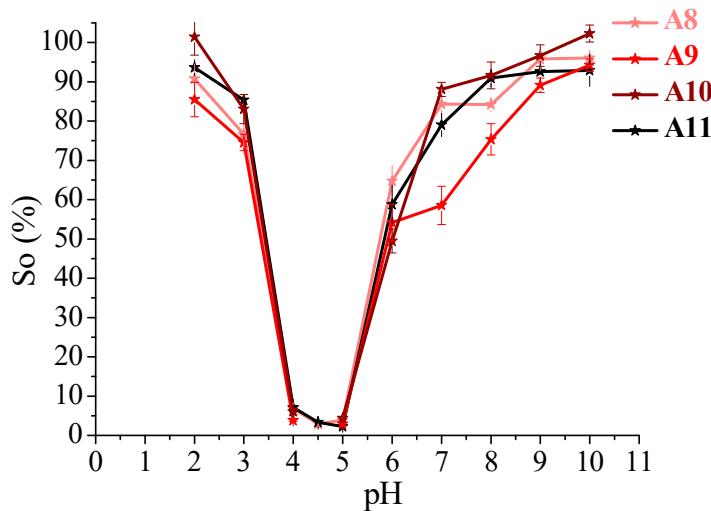


Figura IV.14: Solubilidad (So) de aislados proteicos de CC en función del pH.

Acevedo y col. (2017) informaron un perfil similar de So en función del pH para harinas de CC. A diferencia de lo encontrado en este trabajo de tesis, Mwasaru y col. (1999b) informaron valores de So menores al 10% entre pH 4,0 y pH 8,0 en todos los aislados proteicos de CC (pH 8,5-12,5) y además observaron una relación inversa entre pH de extracción y So. Esta diferencia puede deberse al método de extracción de proteínas utilizado que genera la formación de estructuras proteicas distintas, o bien a diferencias en la concentración proteica utilizada en el ensayo de Solubilidad (5,0% p/v de proteínas). Esto último, fue estudiado por Peyrano y col. (2017), quienes trabajaron con aislados proteicos de caupí y encontraron que a mayor concentración de proteínas utilizada, menor fue el valor de So. Jarpa-Parra y col. (2014) informaron mayor So a pH 10,0 para concentrados proteicos de lenteja obtenidos a distintos pH de extracción (8,0-10,0), favorecido por interacciones hidrofilicas entre los residuos proteicos y el medio acuoso.

IV.3.8. Color

Los aislados proteicos de CC presentaron distintas tonalidades de color marrón (de marrón claro a pardo cobrizo) (Fig. IV.15).

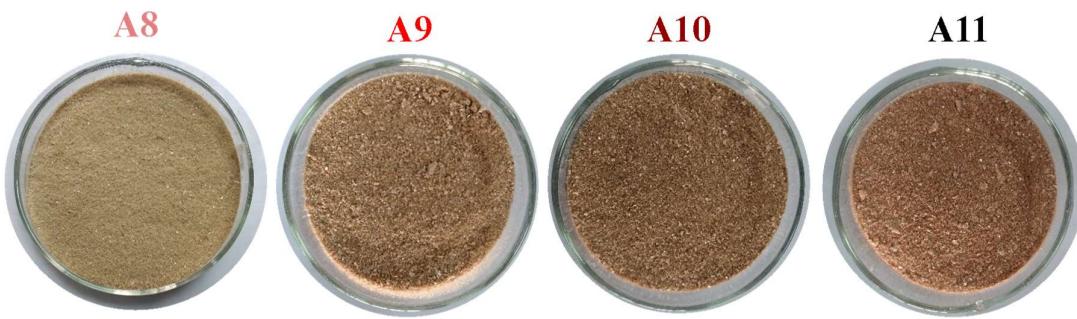


Figura IV.15: Fotografías de aislados proteicos de CC.

Del análisis de los parámetros de color CIELab se obtuvo que a^* y b^* presentaron valores positivos lo que indica que los aislados tienen una apariencia rojiza-amarillenta (Fig. IV.16). El parámetro L^* representa la luminosidad, el parámetro *chroma* (C^*) hace referencia a la saturación del color y el parámetro H^* al tono. En general, con el aumento del pH de extracción el parámetro a^* aumenta, mientras que disminuyen b^* y L^* , al igual que la saturación y el tono (C^* y H^*). A8 presentó el mayor valor de L^* , H^* y C^* con respecto a los demás aislados.

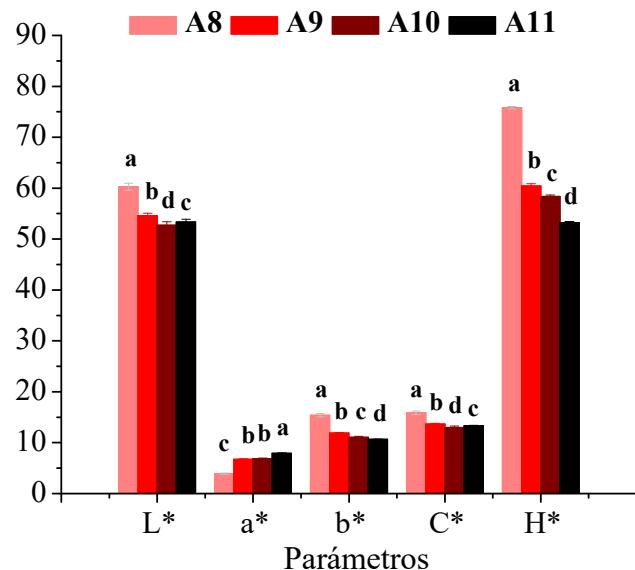


Figura IV.16: Parámetros CieLab (a^* , b^* y L^*) de aislados proteicos de CC. Letras minúsculas distintas en el mismo parámetro indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Los valores encontrados para L^* y b^* fueron inferiores a los encontrados por Ge y col. (2021) para aislados proteicos de distintas legumbres obtenidos a pH 10,0, mientras que los valores de a^* resultaron similares. Mwasaru y col. (1999a) informaron que el color de aislados proteicos de CC y caupí variaba del amarillo-rojizo al marrón oscuro, y

encontraron una relación inversa entre luminosidad (L) y el pH de extracción. Además, relacionaron el contenido de taninos presentes en las semillas con el aumento de la pigmentación en los aislados proteicos al aumentar el pH de extracción. Potin y col. (2019) estudiaron las condiciones de extracción de proteínas de *Cannabis sativa* y encontraron que la concentración de compuestos fenólicos aumentaba de pH 2,0 a 12,0 y la coloración más intensa observada por encima de pH 8,0 se debía a la presencia y oxidación de estos compuestos.

IV.4. Conclusiones parciales

Se lograron extraer las fracciones proteicas mayoritarias de CC, ALB y GLB. Estas fracciones presentaron diferencias en su composición polipeptídica, donde la fracción GLB está conformada por polipéptidos de mayor peso molecular, como se observó en los perfiles electroforéticos y cromatográficos. Los resultados obtenidos por DSC, espectroscopia de fluorescencia e hidrofobicidad superficial, demuestran que la fracción GLB de CC posee una estructura más compacta y menos flexible que la fracción ALB. Además, la fracción GLB tuvo una mayor estabilidad conformacional que la fracción ALB, frente al agente desnaturizante urea. A nivel de la estructura secundaria, la principal diferencia encontrada fue la mayor proporción de hoja plegada β en estructuras agregadas en la fracción ALB respecto de la fracción GLB. Las diferencias en la composición y conformación de estas fracciones proteicas se vieron reflejadas en su So frente a distintos solventes y en función del pH.

Los aislados proteicos de CC presentaron propiedades físico-químicas y perfiles electroforéticos más relacionados a la fracción GLB que a la fracción ALB, aun luego de los cambios conformacionales provocados por el pH de extracción. El aislado A8 presentó un rendimiento en peso y en proteínas inferior a A11 (25-30%), pero resultó más soluble en agua destilada y con una estructura menos desnaturizada ($<\text{Td}$ y $>\Delta\text{H}$). Si bien A11 presentó la mayor recuperación proteica, la solubilidad en agua destilada y *buffer* A fue baja, con una mayor presencia de agregados proteicos. Por otro lado, su estructura fue la más abierta y termoestable, pero la más desnaturizada respecto de los demás aislados estudiados.

Si bien existen varios métodos de extracción y todos son útiles de acuerdo con el fin buscado, el método de extracción alcalina es un método sencillo, rápido y de bajo costo para la obtención de aislados proteicos con distintas propiedades físico-químicas y estructurales que determinarán sus propiedades tecnofuncionales y su posible aplicación

Capítulo IV

como ingredientes alimentarios. En general, el aumento en el pH de extracción para la obtención de aislados proteicos de CC promovió la desnaturización proteica con la consecuente formación de agregados proteicos.

Capítulo V

Influencia del pH y la fuerza iónica
en las propiedades físico-químicas y
estructurales de A8

Se seleccionó el aislado A8 por sus características de solubilidad, hidrofobicidad superficial y color para el estudio del efecto de la variación del pH y la fuerza iónica sobre las propiedades físico-químicas de las proteínas que lo conforman. Para este estudio se ensayaron cuatro condiciones de pH (2,1; 3,9; 6,3 y 8,3) y dos condiciones de fuerza iónica (μ) (0,10 y 0,54).

Las propiedades físico-químicas, como la carga superficial, hidrofobicidad y solubilidad, son factores importantes que contribuyen, por ejemplo, a la difusión y asociación de las proteínas en interfases aceite/agua (o/w) o aire/agua (a/w) (Chang y col., 2015). La carga superficial de una proteína influye en su solubilidad, siendo ésta un prerequisito para que una proteína pueda ser, por ejemplo, un buen agente emulsificante y espumante (Karaca y col., 2011). Estas propiedades manifiestan las interacciones de la estructura proteica con el medio en el cual se encuentran. Además, la conformación inicial de las proteínas y las condiciones de desnaturación determinan el conjunto de interacciones proteína-proteína y proteína-agua que se puedan establecer para la formación una matriz ordenada en el espacio capaz de retener agua.

V.1. Análisis de la composición polipeptídica. Electroforesis SDS-PAGE

La fracción soluble de A8 en las distintas condiciones de pH y fuerza iónica (ítem III.4.1, Materiales y Métodos) mostraron una composición polipeptídica similar. Los polipéptidos correspondientes a vicilina 7S (65, 52, 47 kDa) (Fig. V.1) estuvieron presentes en todas las condiciones ensayadas, excepto a pH 3,9 ($\mu= 0,10$). En esta última condición, están ausentes las bandas de vicilina 7S y se visualiza una banda de 43 kDa (flecha rosa) que no se encontró en las demás condiciones. La ausencia de las bandas de vicilina 7S podrían estar relacionada a la baja So de A8 a este pH (Fig. IV.14).

A baja fuerza iónica ($\mu= 0,10$), se observa una mayor presencia de agregados proteicos solubles (> 94 kDa) a pH 6,3 y 8,3, mientras que a alta fuerza iónica ($\mu= 0,54$) estos agregados se observan con mayor intensidad a pH 3,9 y 8,3.

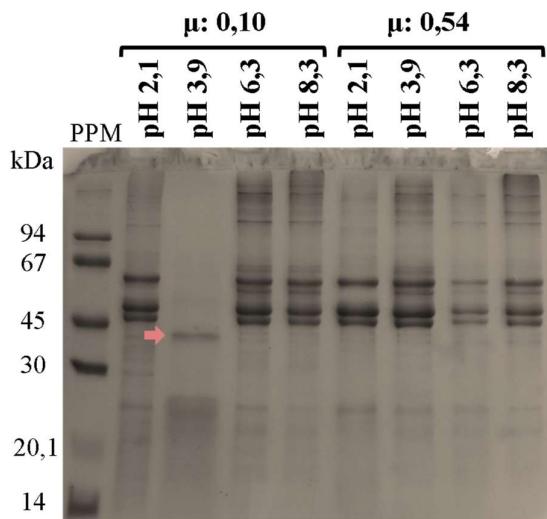


Figura V.1: SDS-PAGE de A8 a distintos pH y fuerza iónica. PPM: patrón de peso molecular. Tinción: Coomassie blue.

Con el incremento de la fuerza iónica, el perfil electroforético de A8 a pH 3,9 cambió sustancialmente como puede observarse en la Figura V.1. En la misma, se observa la presencia de agregados solubles y de polipéptidos de vicilina 7S, desapareciendo la banda de 43 kDa. Felix y col. (2019a) y Felix y col. (2019b) informaron un comportamiento similar de concentrados proteicos de *Cicer arietinum* y *Vicia faba* a distintos pH, detectando en esta última, polipéptidos de mayor PM a pH 8,0 que a pH 3,0.

V.2. Potencial Zeta

El potencial Zeta es un indicador de la carga superficial de una partícula. De acuerdo con Malhotra y Coupland (2004), la variación del potencial Zeta con el pH depende de la cantidad de grupos ionizables y el pKa en las moléculas de proteínas. Los valores de potencial Zeta de A8 a distintos pH se muestran en la Figura V.2. El potencial Zeta de A8 presentó valores positivos a pH 2,1 y 3,9 mientras que a pH 6,3 y 8,3 fueron negativos. Estos resultados son los esperados considerando que el pI de las vicilinas 7S de CC, principal componente de A8 (Fig. V.1), se encuentra entre pH 4,5 y 5,5 (Krishnan y col., 2017). Entre los aminoácidos más abundantes de CC se encuentran el ácido aspártico y el ácido glutámico, cuyos pKa presentan valores de 3,65 y 4,25 respectivamente localizándose generalmente en la superficie de las proteínas (Johnston y col., 2015).

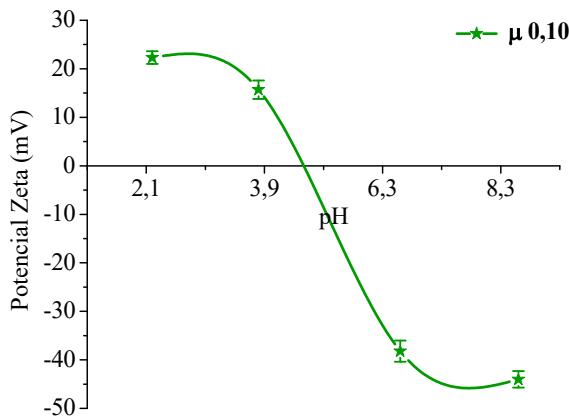


Figura V.2: Potencial Zeta de soluciones de A8 en agua a distintos pH.

Los valores de potencial Zeta fueron similares a los informados en la literatura para aislados proteicos de soja, garbanzo, lenteja y poroto (Johnston y col., 2014; Joshi y col., 2012; Tang y Sun, 2011). Una carga superficial alta de las proteínas promueve su hidratación y solubilidad, lo que a su vez favorece, por ejemplo, la migración a las interfas o/w y a/w (McClements, 2016).

No se logró medir el potencial zeta en condiciones de alta fuerza iónica, pero es esperable que disminuya con el incremento de esta, como fuera informado por diversos autores (Liu y col., 2020; McClements, 2016; Taha y col., 2019; Tian y col., 2021; Zhang y col., 2010). En este sentido, Zhang y col., (2010) sugirieron que, como consecuencia del apantallamiento efectivo de las interacciones electrostáticas entre las proteínas, se produce la disminución de los valores de potencial Zeta.

V.3. Fluorescencia intrínseca

La fluorescencia intrínseca de las proteínas, principalmente de los residuos de Trp, depende en gran medida del plegamiento de las moléculas, por lo cual puede proporcionar información acerca de los cambios conformacionales en la estructura terciaria de las proteínas (Jin y col., 2015). En la Figura V.3a y 3b se presentan los espectros de fluorescencia de A8 en las distintas condiciones de pH y fuerza iónica. A baja fuerza iónica, la longitud de onda de máxima emisión ($\lambda_{\text{máx}}$) fue mayor a pH 3,9 y a pH 2,1, lo cual está relacionado a que las especies solubles presentes son diferentes (Fig. V.1) y a que en esta última condición las proteínas están parcialmente desnaturalizadas. A pH 3,9, el $\lambda_{\text{máx}}$ alcanza el valor característico de residuos de Trp completamente expuestos al solvente (Lakowitz, 2006) y a su vez es muy cercano al obtenido para la fracción ALB ($\lambda_{\text{máx}} = 346$

Capítulo V

nm) (Fig. IV.10a). A pH 3,9 las proteínas pueden exponer mayor número de residuos hidrofóbicos y aumentar las interacciones hidrofóbicas entre las moléculas, lo que, sumado a la ausencia de carga superficial, da lugar a una reducción de la solubilidad. Rahmati y col. (2018) informaron valores entre 331-333 nm de $\lambda_{\text{máx}}$ para aislados proteicos de *Phaseolus vulgaris* a pH 3,0 y 7,0, y cercano a 350 nm a pH 5,0. A este pH encontraron que la intensidad de fluorescencia fue menor que a pH 7,0, posiblemente debido a una mayor interacción entre las regiones hidrofóbicas que actuarían como *quenchers*.

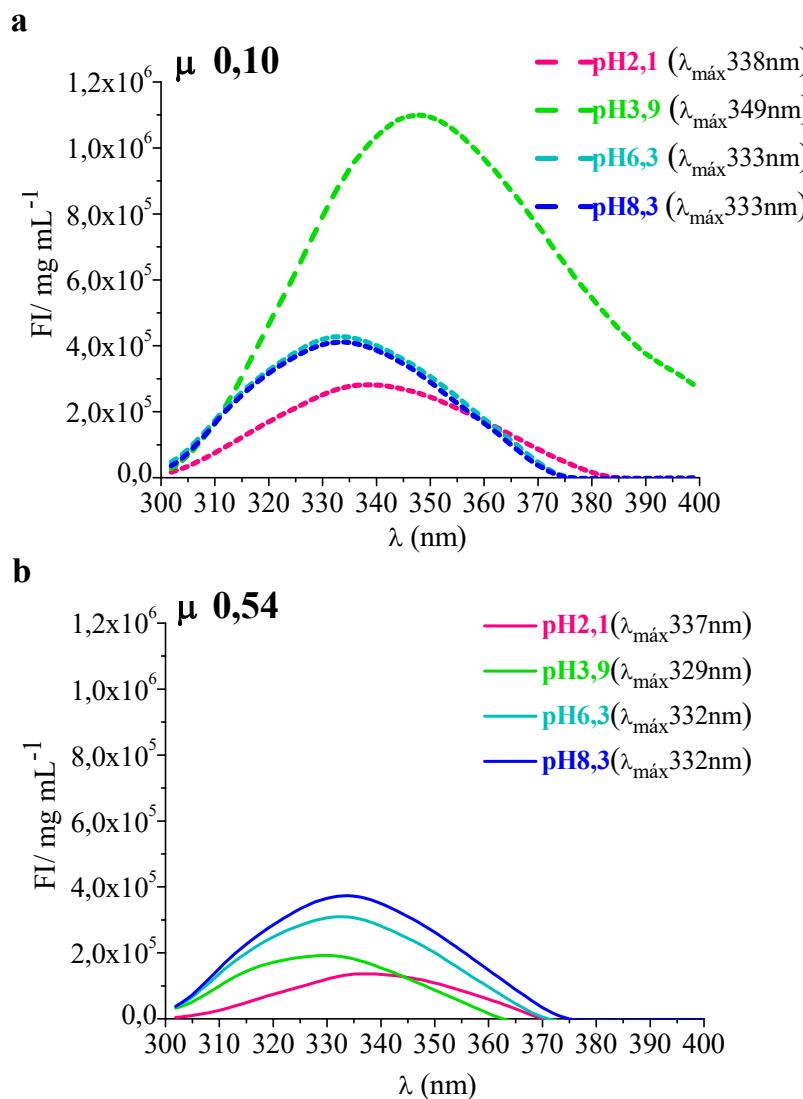


Figura V.3: Espectros de fluorescencia intrínseca (FI/mg/mL) de A8 a distintos pH y fuerza iónica.

El aumento de la fuerza iónica provocó una disminución en la intensidad de fluorescencia a todos los pH, principalmente a pH 3,9 donde disminuyó en un 80%,

acompañado de un corrimiento significativo de $\lambda_{\text{máx}}$ hacia el azul. Esto está relacionado al perfil polipeptídico de la fracción soluble de A8 a las dos fuerzas iónicas ensayadas; en los demás pH, $\lambda_{\text{máx}}$ no presentó cambios ($p < 0,05$). Así mismo, Jiang y col. (2015) informaron una disminución de la intensidad de fluorescencia con la fuerza iónica en aislados proteicos de soja (pH 7,6).

En proteínas globulares, una estructura más compacta se relaciona con una conformación más esférica, lo cual puede tener un efecto negativo para la ubicación de las proteínas en la interfase. Las proteínas de estructura más abierta y con mayor capacidad de reacomodarse en la interfase permitirían la formación de una capa interfacial más fuerte (Rahmati y col., 2018).

V.4. Estabilidad térmica

Se evaluó la influencia del pH y de la fuerza iónica en la estabilidad térmica de A8 mediante DSC. En la Figura V.4 se presentan los termogramas de A8 en las distintas condiciones analizadas. Los termogramas de A8 en las distintas condiciones de pH y fuerza iónica presentaron un único pico endotérmico, al igual que los aislados proteicos de CC obtenidos a distintos pH (Fig. IV.4b). La desnaturización proteica implica transiciones cooperativas donde se produce la ruptura de varias uniones en simultáneo. Un pico estrecho indica una gran cooperatividad, mientras que un pico ancho indica que mientras algunas proteínas se desnaturizan, otras permanecen nativas.

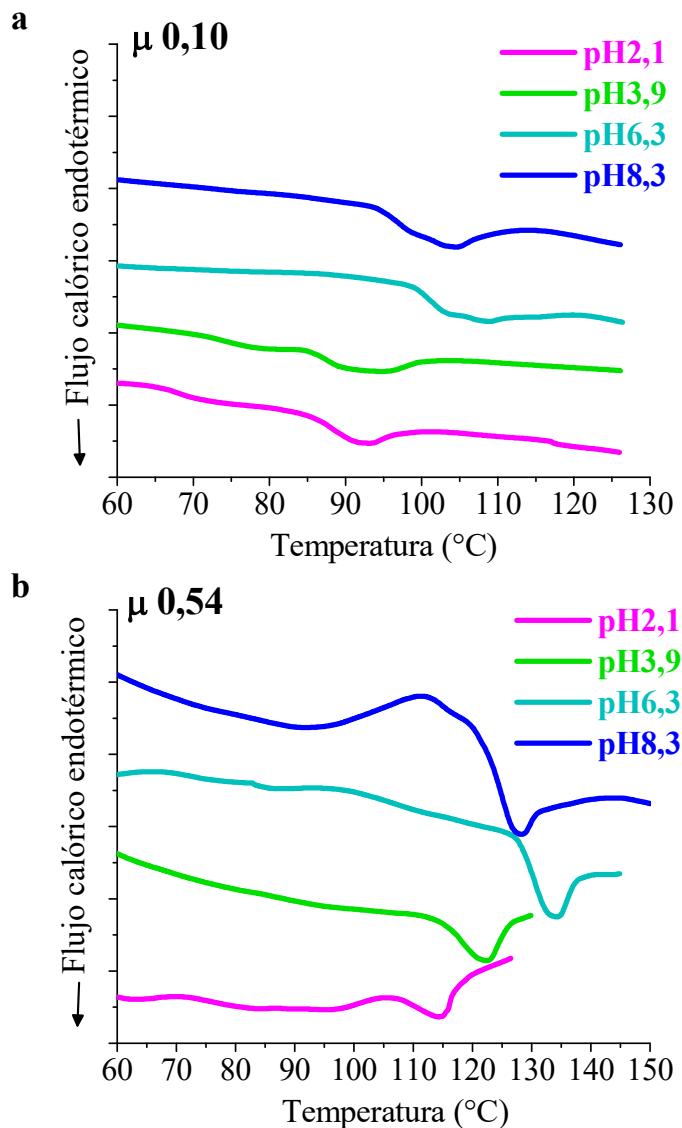


Figura V.4: Termogramas de A8 a distintos pH y fuerza iónica.

A baja fuerza iónica, las proteínas de A8 presentaron menores temperaturas de desnaturización (T_d) y picos más anchos que en condiciones de alta fuerza iónica. La mayor estabilidad térmica de las proteínas en estas condiciones ($\mu = 0,54$) puede atribuirse al mayor contenido salino de este nuevo entorno.

A partir de los termogramas se obtuvieron los distintos parámetros que se presentan en la Tabla V.1 (T_d ; $\Delta T_{1/2}$ o temperatura de desnaturización media que indica el ancho medio del pico; ΔH que es la variación en la entalpía de transición).

Tabla V.1: Valores de Td, $\Delta T_{1/2}$ y ΔH de A8 a distintos pH y fuerza iónica

pH	Fuerza iónica (μ)	Td (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	ΔH (J/g)
2,1	0,10	92,61 \pm 1,46c	6,86 \pm 0,94b	3,11 \pm 0,23b
3,9		92,32 \pm 0,68c	10,54 \pm 0,08a	2,75 \pm 0,13b
6,3		107,19 \pm 0,26a	11,67 \pm 0,75a	4,83 \pm 0,10a
8,3		103,29 \pm 0,02b	10,76 \pm 0,33a	4,90 \pm 0,19a
2,1	0,54	115,24 \pm 0,61c	6,59 \pm 1,10a	3,70 \pm 0,57b
3,9		124,11 \pm 2,38b	7,34 \pm 0,76a	7,95 \pm 2,76ab
6,3		132,39 \pm 2,41a	6,24 \pm 0,08a	6,09 \pm 0,36ab
8,3		127,87 \pm 0,64ab	6,50 \pm 1,72a	9,90 \pm 0,64a

Promedio \pm desvío estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

En general, a baja fuerza iónica los valores de Td y ΔH fueron estadísticamente diferentes ($p<0,05$) a los distintos pH, lo cual evidencia cambios apreciables en la estructura de las proteínas. Los valores de Td y ΔH obtenidos para los pH por debajo del pI resultaron similares entre sí ($p\geq0,05$) y menores a los valores obtenidos a pH mayores al pI; a pH 2,1 las proteínas estarían más desnaturalizadas y este comportamiento se relaciona con lo encontrado en FI (Fig. V.3a). A pH 2,1 se obtuvo el menor valor de $\Delta T_{1/2}$, lo cual sugiere que en esta condición las proteínas de A8 se desnaturalizan de manera más cooperativa que en los otros pH. Las proteínas adquieren diferentes estructuras cuando se encuentran bajo condiciones ácidas o neutras (Alonso y col., 1991), por lo tanto, es esperable que esto afecte las interacciones intermoleculares que se puedan establecer. Sun y Arntfield (2011) estudiaron el efecto del pH en las propiedades térmicas de proteínas de arveja en un rango de 4,0-8,0 y encontraron que el valor de Td fue mayor a pH 5,0-6,0 y disminuía a pH más ácidos y alcalinos, mientras que ΔH fue mayor a pH 6,0.

Al aumentar la fuerza iónica, la Td aumentó a todos los pH en igual proporción (20-25%) y los cambios inducidos por la fuerza iónica causaron un aumento en la cooperatividad del proceso (menores valores de $\Delta T_{1/2}$). Los cambios en los parámetros de estabilidad térmica producidos por la variación del pH fueron menores a lo encontrado a baja fuerza iónica, esto indicaría que el aumento en la estabilidad térmica por la presencia de sales es mayor que el efecto desnaturalizante por la variación de pH (Sun y Arntfield, 2011). En nuestros resultados, ΔH fue estadísticamente diferente sólo a los pH extremos.

Capítulo V

El incremento de Td en respuesta al aumento de la fuerza iónica también fue informado para aislados proteicos de *Phaseolus vulgaris* (Zhang y col., 2010) y *Pisum Sativum* (Shand y col., 2007; Sun y Arntfield, 2011; Tanger y col., 2022) y para globulina 11S de *Helianthus annus* (Molina y col., 2004).

V.5. Solubilidad proteica

La Solubilidad proteica (So) de A8 a baja fuerza iónica muestra un perfil típico en forma de U (Fig. V.5), con un mínimo a pH 3,9, cercano al pI de las proteínas de legumbres (Ladjal-Ettoumi y col., 2015; McClements y col., 2017), y valores elevados a pH 2,1 (96%) y pH 8,3 (89%). El mínimo de So encontrado a pH 3,9 concuerda con la ausencia de la banda de vicilina 7S en la fracción soluble de A8 (Fig. V.1). Resultados similares fueron reportados para aislados de garbanzo, lenteja y arveja (Ladjal-Ettoumi y col., 2015; Tanger y col., 2022). La elevada So a pH 2,1 y pH 8,3 está favorecida por la mayor carga neta de las proteínas (Chang y col., 2015). El valor absoluto del potencial Zeta a pH 6,3 fue mayor que a pH 2,1 pero con una So menor; esto podría deberse a una menor desnaturización de las proteínas, como se evidencia por los valores de $\lambda_{\text{máx}}$ (Fig. V.3a) y ΔH (Tabla V.1), lo que no favorecería la interacción del agua con la estructura proteica.

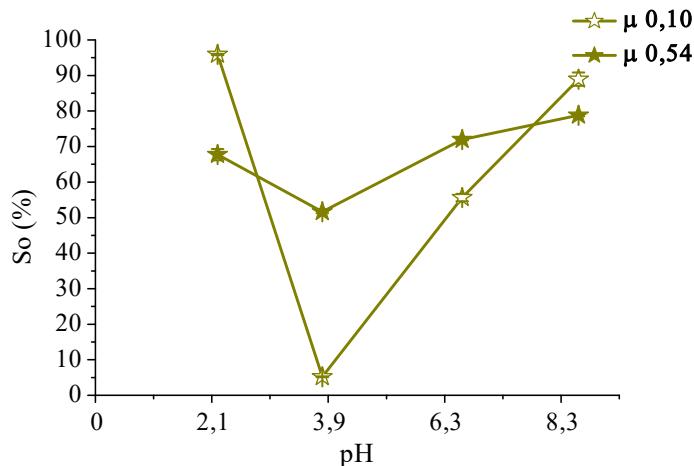


Figura V.5: Perfil de Solubilidad proteica (So) de A8 a distintos pH y fuerza iónica.

El incremento en la fuerza iónica produce cambios en el perfil de So, las diferencias por la variación del pH se vuelven menos pronunciadas, presentando un mínimo de So $>50\%$. La So se incrementa diez veces a pH 3,9 y alrededor de un 27% a pH 6,3, sin embargo disminuye a pH 2,1 y 8,3. El efecto de la fuerza iónica en la solubilidad de las proteínas es resultado de interacciones electrostáticas, fenómenos de solvatación, fenómenos de *salting-in* y *salting-out* (Kinsella, 1979). Las interacciones proteína-proteína

se vuelven más atractivas a medida que aumenta la concentración de sal debido al apantallamiento de la doble capa eléctrica (Curtis y Lue, 2006; Taha y col., 2019), esto podría explicar la disminución de So a pH 2,1 y 8,3, pero no el incremento a pH 3,9 y 6,3. El aumento de So a pH 3,9 puede deberse a interacciones electrostáticas favorables entre los iones y el gran momento dipolar de la cadena peptídica (Curtis y Lue, 2006), así agregados insolubles se vuelven solubles. A este efecto se suma la menor exposición de regiones hidrofóbicas (disminución en la intensidad de fluorescencia y corrimiento hacia el azul de $\lambda_{\text{máx}}$) (Fig. V.3b), por lo cual las proteínas tienen menor posibilidad de interaccionar entre sí. El incremento de So a pH 6,3 puede resultar del efecto combinado entre la carga negativa de las proteínas (Fig. V.2) y el efecto *salting-in* que contribuirían a disociar los agregados proteicos (Fig. V.1). Un comportamiento similar en el perfil de So debido al aumento de la concentración de NaCl fue descripto por Tanger y col. (2022) para aislado proteico de arveja.

Los valores de So a baja fuerza iónica son superiores a los informados por Mwasaru y col. (2000) para aislado proteico de CC, probablemente debido al mayor grado de desnaturación por el método de obtención empleado y la consecuente formación de agregados insolubles. Así mismo, estos autores encontraron que cuando la concentración de NaCl era superior a 0,2 M ($\mu=0,2$), la So aumentaba en todo el rango de pH con un corrimiento del mínimo de pH 4 a pH 6.

Los resultados aquí expuestos sugieren que la baja So de A8 a pH cercanos al pI puede ser mejorada incrementando la fuerza iónica del solvente utilizado en la dispersión de las proteínas.

V.6. Tensión interfacial

En general, la disminución de la tensión interfacial de las interfas o/w y a/w implica tres pasos. En primer lugar, la migración de proteínas de la fase acuosa a la interfase, luego su adsorción en la interfase donde pueden sufrir o no cambios conformacionales; y por último el desarrollo de interacciones intermoleculares para formar la capa interfacial de proteínas (Yang y col., 2018). Además de estos procesos, el comportamiento superficial de las proteínas es influenciado por su composición y conformación cuando se encuentran en solución y en la interfase.

La tensión interfacial de equilibrio (γ_{eq}) de la interfase o/w y a/w de dispersiones de A8 (0,5% p/p) a distintas condiciones de pH y fuerza iónica se presentan en la Tabla V.2 y Tabla V.3, respectivamente.

Capítulo V

A8 disminuye alrededor de un 40% el valor de γ_{eq} de la interfase o/w en comparación con el control ($21,2 \pm 0,09$ mN/m), debido a sus propiedades anfifílicas (Tabla V.2).

Tabla V.2: Tensión interfacial de equilibrio (γ_{eq}) o/w de A8 a distinto pH y fuerza iónica

pH	Fuerza iónica (μ)	γ_{eq} (mN/m)
2,1	0,10	$12,12 \pm 0,12$ ab
3,9		$12,64 \pm 0,13$ a
6,3		$12,45 \pm 0,36$ a
8,3		$11,84 \pm 0,11$ b
2,1	0,54	$13,64 \pm 0,08$ a
3,9		$12,73 \pm 0,23$ b
6,3		$11,74 \pm 0,23$ c
8,3		$11,53 \pm 0,04$ c

Promedio \pm desvío estándar. Letras distintas en la misma columna para cada fuerza iónica indican diferencias significativas ($p<0,05$).

A baja fuerza iónica, el γ_{eq} fue menor a pH 8,3 mientras que no hubo diferencia significativa ($p>0,05$) entre el resto de los pH analizados. Chang y col. (2015) informaron que aislados proteicos de arveja, soja y lenteja disminuían a 8-14 mN/m la γ_{eq} o/w, y esta disminución era mayor a pH 7,0 que a pH 3,0 y 5,0, resultando similar para estos pH, a pesar de las diferencias encontradas en sus propiedades físico-químicas.

Con el aumento de la fuerza iónica, γ_{eq} mejoró únicamente a pH 6,3 mientras que empeoró a pH 2,1, lo cual podría estar relacionado con los cambios de So previamente analizados (Fig. V.5). El valor de γ_{eq} permaneció constante ($p<0,05$) a pH 3,9, a pesar del aumento de So, sugiriendo que las proteínas insolubles presentes a baja fuerza iónica podrían ser efectivas para reducir γ_{eq} , como fue propuesto por Chang y col. (2015). La efectividad de A8 para reducir γ_{eq} fue mejor a los pH que se encuentran por encima de su pI, probablemente debido a que las proteínas tienen buena So (Fig. V.5) y transportan una mayor carga eléctrica (Fig. V.2). El aumento de la carga neta en las proteínas favorece la flexibilidad proteica y su difusión a la interfase (Trigui y col., 2021).

Los resultados obtenidos para la interfase a/w indican que todas las dispersiones de A8 presentaron una buena actividad interfacial (Tabla V.3), disminuyendo γ_{eq} alrededor de un 40% en comparación con el control (71,52 mN/m).

Tabla V.3: Tensión interfacial de equilibrio (γ_{eq}) a/w de A8 a distinto pH y fuerza iónica.

pH	Fuerza iónica (μ)	γ_{eq} (mN/m)
2,1	0,10	42,69 ± 0,45b
3,9		41,69 ± 0,01c
6,3		42,02 ± 0,04bc
8,3		44,95 ± 0,28a
2,1	0,54	44,50 ± 0,17a
3,9		42,19 ± 0,05c
6,3		43,59 ± 0,30b
8,3		44,85 ± 0,06a

Promedio ± desvío estándar. Letras distintas en la misma columna para cada fuerza iónica indican diferencias significativas ($p<0,05$).

A baja fuerza iónica, el valor más alto de γ_{eq} se obtuvo a pH 8,3 mientras que el menor valor se obtuvo a pH 3,9. Las especies de menor PM encontradas a pH 3,9 (Fig. V.1) difunden con mayor facilidad a la interfase a/w (Rahmati y col., 2018) favoreciendo la disminución del γ_{eq} . Además, a este pH la repulsión electrostática entre las proteínas es baja y se favorecen las interacciones hidrofóbicas, lo que podría contribuir a la adsorción de las proteínas en la interfase. Los factores que contribuyen a la exposición de regiones hidrofóbicas de las proteínas al medio acuoso, aumentan su actividad superficial (Fameau y Salonen, 2014). Un comportamiento distinto fue informado por Ge y col. (2021), quienes encontraron menores valores de γ_{eq} a pH 7,0 y 9,0 respecto de pH 3,0 y 5,0 para aislados proteicos de *Cicer arietinum*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Vigna radiata*, *Vigna unguiculata* y *Vigna angularis*.

Al aumentar la fuerza iónica, se observó un incremento en los valores de γ_{eq} , lo que indicaría que la habilidad de las proteínas para ubicarse en la interfase se ve alterada por la menor repulsión de cargas y por los cambios conformacionales que ocurrieron en presencia del mayor contenido salino (Fig. V.3 y V.4). Las proteínas a pH 3,9 fueron más efectivas en la disminución de γ_{eq} .

V.7. Conclusiones parciales

El pH y la fuerza iónica del medio no influyeron en la composición polipeptídica de la fracción soluble de A8, excepto a pH 3,9 ($\mu= 0,10$) donde las bandas características no se observaron debido a su baja So. Sin embargo, las variaciones tanto en el pH como en la

Capítulo V

fuerza iónica provocaron cambios conformacionales en las proteínas de A8 y como consecuencia, se obtuvieron diferencias en sus propiedades físico-químicas.

A baja fuerza iónica, la carga superficial de las proteínas fue la esperada de acuerdo con el pH del medio. Con los resultados obtenidos de FI y DSC fue evidente una mayor desnaturalización de las proteínas a pH por debajo del pI de A8. Sin embargo, cuando la fuerza iónica del medio fue mayor, los cambios conformacionales debidos a la variación del pH resultaron menores. Esta menor diferencia fue evidente en el perfil de So a alta fuerza iónica dado que la So es el resultado de algunos factores como la carga superficial de las proteínas, su plegamiento, el balance hidrofilico/hidrofóbico en la superficie proteica, entre otros.

Las dispersiones de A8 disminuyen la tensión interfacial en la interfase o/w y a/w con ligeras diferencias de acuerdo con el pH y fuerza iónica del medio, aún a pH cercano a pI. Las diferencias son ligeras posiblemente debido a la concentración de A8 utilizada, la cual es bastante alta.

Es de esperar que los cambios encontrados en las propiedades fisicoquímicas y estructurales ayuden a potenciar A8 como agente surfactante para la obtención de emulsiones y espumas, o bien como agente espesante o gelificante mediante la formación de una red proteica capaz de retener agua.

Capítulo VI

Propiedades superficiales –
Propiedades Emulsionantes

Como vimos en el Capítulo V, las propiedades físico-químicas de las proteínas de A8 de CC fueron afectadas por el pH y la fuerza iónica del medio. En este capítulo se evalúa cómo influyen estas variables en sus propiedades emulsificantes, para lo cual se ensayaron cuatro concentraciones de proteína (0,5; 1,0; 1,5 y 2,0% p/p). En cada caso se estudió la formación y estabilidad de los sistemas obtenidos, los posibles mecanismos de desestabilización y su relación con las propiedades físico-químicas de A8.

VI.1. Distribución de tamaño de partícula

Muchas propiedades importantes de los productos alimenticios basados en emulsiones están determinadas por el tamaño de las gotas que componen la emulsión (McClements, 2016). El diámetro promedio en superficie ($D_{3,2}$) y el diámetro promedio en volumen ($D_{4,3}$) son frecuentemente utilizados para la caracterización del tamaño de las gotas.

En la Figura VI.1 se presentan las distribuciones de tamaño de partícula en % de volumen de las emulsiones o/w preparadas a partir de dispersiones de A8 en función de la concentración de proteínas. La mayoría de las emulsiones recién preparadas presentaron una distribución monomodal, observándose un ligero hombro hacia tamaños más pequeños cercanos al micrón (1 μm). Con el aumento de la concentración de proteína las gotas disminuyeron su tamaño, principalmente a pH 8,3; sin embargo, esto fue acompañado por un incremento en la polidispersidad al 1,5 y 2,0% p/p, detectándose una distribución bimodal en esta última.

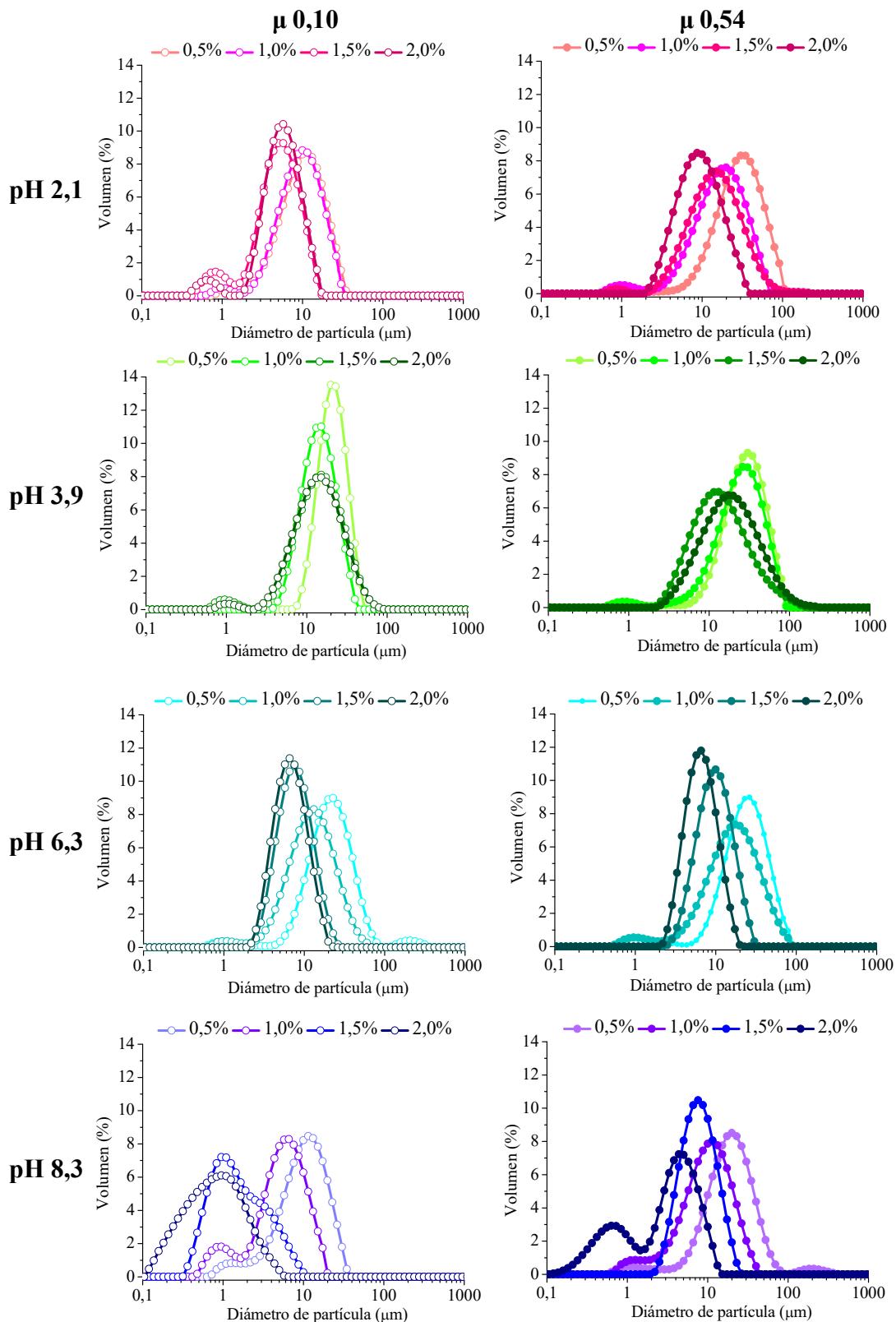


Figura VI.1: Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones o/w de A8 a distinto pH y fuerza iónica en función de la concentración de proteínas.

Baja fuerza iónica

En la Figura VI.2a y 2b se observa la variación del parámetro $D_{3,2}$ de las emulsiones o/w con la concentración de proteína y con el pH, respectivamente. Cuando la concentración de proteína aumenta, la cantidad de proteína disponible para ubicarse en la interfase es mayor por lo cual el valor de $D_{3,2}$ disminuye en la mayoría de los casos (Fig. VI.2a). Teniendo en cuenta la mínima y máxima concentración de proteína ensayada (0,5 y 2,0% p/p), se observa que el mayor porcentaje de disminución de $D_{3,2}$ fue a pH 8,3 (91,4%), mientras que el menor se obtuvo a pH 2,1 (35,7%). A concentraciones suficientemente elevadas de proteína, la cantidad de emulsificante presente será suficiente para cubrir toda la superficie de las gotas formadas y así prevenir fenómenos de coalescencia (Mao y McClements, 2011). Es sabido que a una relación constante de o/w y similares condiciones de homogeneización, existe una concentración crítica de proteína a partir de la cual el valor de $D_{3,2}$ no varía (Ladjal-Ettoumi y col., 2016). En las emulsiones o/w de A8, esta concentración se encuentra entre 1,5-2,0% a pH 2,1, 3,9 y 6,3. Joshi y col. (2012) y Ladjal-Ettoumi y col. (2016) informaron una concentración similar utilizando proteínas de lenteja (1,0% p/v a pH 7,0), y de garbanzo, lenteja y arveja (1,5% p/v a pH 3,0), respectivamente; a pesar de las diferencias en cuanto a la fracción de aceite (10% de aceite) y el método de homogeneización ensayado.

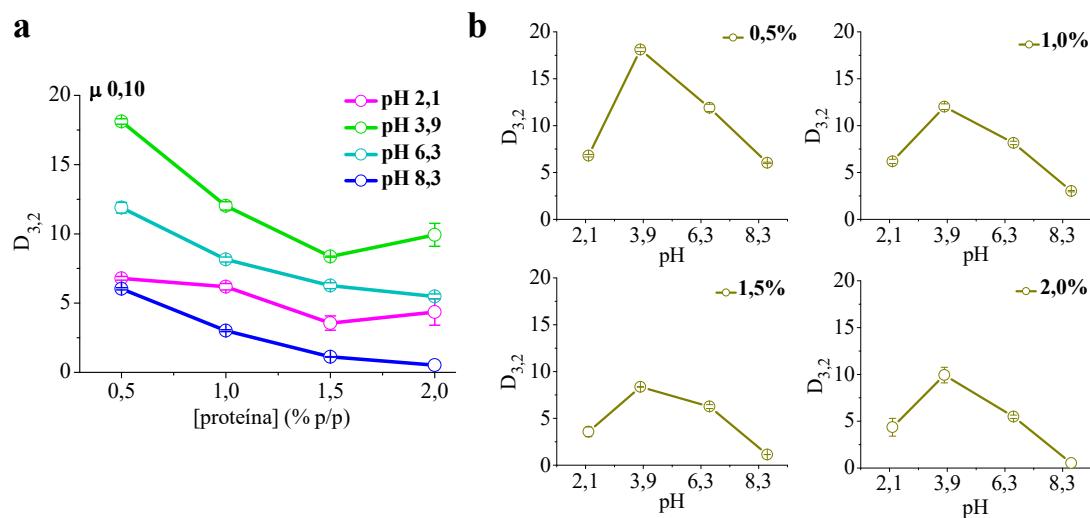


Figura VI.2: Diámetro promedio en superficie ($D_{3,2}$) de emulsiones o/w de A8 **a)** en función de la concentración de proteína, **b)** en función del pH.

Teniendo en cuenta la variación del tamaño de las gotas en función del pH (Fig. VI.2b), el valor más alto de $D_{3,2}$ se obtuvo a pH 3,9 y el menor valor a pH 8,3, independientemente de la concentración de proteína analizada. Resultados similares a los

Capítulo VI

nuestros fueron informados para emulsiones estabilizadas con aislados proteicos de lenteja, arveja y haba (Chang y col., 2015; Gumus y col., 2017). El comportamiento observado se ha atribuido al hecho de que a pH cercano al pI de las proteínas adsorbidas, la carga eléctrica de las gotas es baja y la repulsión electrostática no es suficiente para impedir interacciones atractivas del tipo *van der Waals*. La formación de gotas de mayor tamaño a pH 3,9 es consecuencia de una cantidad insuficiente de proteína para cubrir el área interfacial creada (baja So, ver Fig. V.5), por lo que fenómenos de coalescencia pueden ocurrir durante la emulsificación (Suarez y Añón, 2018), a pesar de que en esta condición las proteínas de A8 presentaron la capacidad de disminuir γ_{eq} . Los menores valores de D_{3,2} a pH 8,3 son consecuencia de distintos factores que incluyen una alta So (permite rápida difusión de las proteínas a la interfase), un alto valor de potencial Zeta (facilita el movimiento a la interfase y aumenta la repulsión electrostática entre las gotas) y el menor valor de γ_{eq} encontrado (Tabla V.2) (Chang y col., 2015).

En la Tabla VI.1 se resumen los valores de D_{4,3} en ausencia y en presencia de SDS, junto con el índice de polidispersidad (span) de las emulsiones o/w de A8 a baja fuerza iónica. Con el aumento de la concentración de proteína se observa una disminución progresiva de D_{4,3}, principalmente a pH 6,3 (73,5%) y 8,3 (90,4%). Este comportamiento se evidencia en el desplazamiento hacia la izquierda de los perfiles de distribución (Fig. VI.1). Resultados similares fueron obtenidos por Tian y col. (2021) para emulsiones de β -conglicinina (7S) de soja. A pesar de que D_{4,3} disminuyó, hubo un aumento de los valores de span a pH 3,9 y 8,3 y una disminución a pH 6,3; a pH 2,1 no se encontró una tendencia definida.

Las emulsiones a pH 2,1 y 8,3 presentaron valores similares de D_{4,3} a 0,5% p/p, pero con el aumento de la concentración de proteína, la disminución de D_{4,3} fue mayor a pH 8,3 (90,4%) que a pH 2,1 (42,1%) (Tabla VI.1). Las gotas más grandes se obtuvieron a pH 3,9 en todo el rango de concentración ensayado, mientras que la polidispersidad en el tamaño de las gotas fue mayor a pH 8,3 (2,0% p/p), como puede observarse en el mayor valor de span (Tabla VI.1) así como en el ancho de la curva de distribución de los volúmenes de las gotas (Fig. VI.1). Tian y col. (2021) informaron menores valores de D_{4,3} a pH 3,0 y 8,0 que a pH 5,0 para las emulsiones de 7S de soja (1,0% p/v).

Tabla VI.1: Diámetro promedio en volumen ($D_{4,3}$) en ausencia y presencia de SDS e índice de polidispersidad (span) de emulsiones o/w de A8 a distinto pH y concentración de proteína ($\mu=0,10$).

pH	Proteína % (p/p)	$D_{4,3}$	$D_{4,3}$ SDS	Span
2,1	0,5	$10,41 \pm 0,31$ c	$2,79 \pm 0,03$ c	$1,65 \pm 0,01$ a
3,9		$20,65 \pm 0,00$ b	$18,60 \pm 0,00$ a	$0,98 \pm 0,05$ b
6,3		$25,00 \pm 1,27$ a	$5,17 \pm 0,01$ b	$1,67 \pm 0,02$ a
8,3		$10,51 \pm 0,28$ c	$2,37 \pm 0,00$ d	$1,72 \pm 0,02$ a
2,1	1,0	$10,93 \pm 2,02$ b	$5,76 \pm 0,11$ b	$1,68 \pm 0,10$ b
3,9		$14,84 \pm 0,36$ a	$9,67 \pm 0,00$ a	$1,28 \pm 0,01$ c
6,3		$14,60 \pm 0,98$ a	$4,01 \pm 0,01$ c	$1,87 \pm 0,04$ a
8,3		$5,68 \pm 0,12$ c	$1,38 \pm 0,00$ d	$1,90 \pm 0,01$ a
2,1	1,5	$5,51 \pm 0,34$ c	$2,81 \pm 0,18$ b	$1,50 \pm 0,14$ c
3,9		$16,52 \pm 0,83$ a	$4,82 \pm 0,00$ a	$1,89 \pm 0,05$ b
6,3		$7,73 \pm 0,34$ b	$0,98 \pm 0,00$ c	$1,30 \pm 0,03$ d
8,3		$1,96 \pm 0,03$ d	$0,89 \pm 0,00$ c	$2,85 \pm 0,04$ a
2,1	2,0	$6,02 \pm 0,46$ b	$16,10 \pm 0,48$ a	$1,36 \pm 0,03$ c
3,9		$16,91 \pm 0,93$ a	$4,09 \pm 0,00$ b	$1,94 \pm 0,02$ b
6,3		$6,63 \pm 0,24$ b	$0,84 \pm 0,00$ c	$1,24 \pm 0,01$ d
8,3		$1,01 \pm 0,03$ c	$0,77 \pm 0,00$ c	$2,57 \pm 0,06$ a

Promedio \pm desvío estándar. Letras distintas en la misma columna para cada concentración de proteína indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Con el agregado de SDS a las emulsiones se puede inhibir la floculación de las gotas de aceite por desplazamiento de las proteínas de la interfase, lo cual permite la medición del tamaño de las gotas individuales (Ladjal-Ettoumi y col., 2016; Liang y Tang, 2013). En la Figura VI.3 se presentan los perfiles de distribución de las gotas en ausencia y en presencia de SDS para las emulsiones obtenidas a 1,5 y 2,0% p/p. En la mayoría de los casos se observó un desplazamiento hacia tamaños de partícula más pequeños, acompañado de una disminución en los valores de $D_{4,3}$ SDS (Tabla VI.1), lo cual evidencia distintos grados de floculación, donde el mayor cambio se encontró en la emulsión a pH 6,3. Sin embargo, este comportamiento no se repite a pH 2,1 (2,0% p/p), donde se generó una población de gotas de mayor tamaño al agregar SDS (el valor de $D_{4,3}$ SDS fue mayor que $D_{4,3}$). Este comportamiento podría deberse a que la cantidad de SDS utilizada en la

Capítulo VI

medición fue insuficiente para cubrir el exceso de proteína y, por lo tanto, para detener las interacciones entre ellas, o bien a que las proteínas no adsorbidas en exceso promovieron la floculación por depleción. Esto último sería válido solo si se forman agregados proteína/SDS lo suficientemente grandes para producir este fenómeno. Además, el SDS podría estar promoviendo la agregación de proteínas y entre las gotas de emulsión ya que a pH 2,1 la carga de las proteínas y del SDS son opuestas; este efecto se observa solo a altas concentraciones de proteínas.

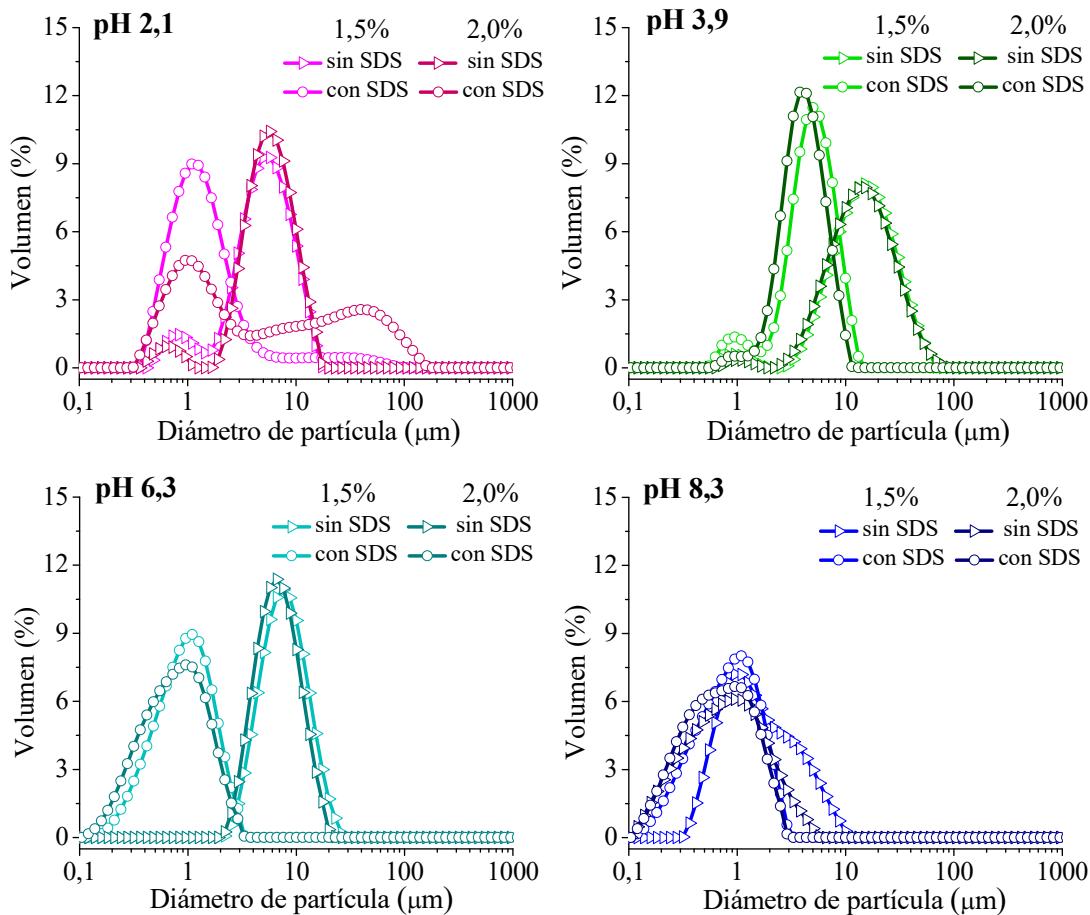


Figura VI.3: Distribución de tamaño de partícula en ausencia y presencia de SDS de las emulsiones o/w de A8 al 1,5 y 2,0% p/p a distinto pH ($\mu = 0,10$).

Alta fuerza iónica

Al igual que lo obtenido a baja fuerza iónica, $D_{3,2}$ disminuyó con el aumento de la concentración de proteína cuando $\mu = 0,54$ (Fig. VI.4a y 4b). Esta disminución fue similar a la observada a baja fuerza iónica únicamente a pH 6,3 y 8,3, mientras que fue mayor a pH 2,1 (~50%) y fue menor a pH 3,9 (30%). A pH 3,9 se observó un aumento en el valor de $D_{3,2}$ al 2,0% p/p, probablemente debido a un exceso de proteínas no adsorbidas que

promovieron la floculación de las gotas por depleción (Ladjal-Ettoumi y col., 2016). La concentración crítica de proteínas en estas condiciones se encuentra entre 1,0-1,5% p/p a pH 2,1, 6,3 y 8,3; sin embargo, se obtuvieron valores más bajos de $D_{3,2}$ cuando la concentración de proteína fue del 2,0% p/p.

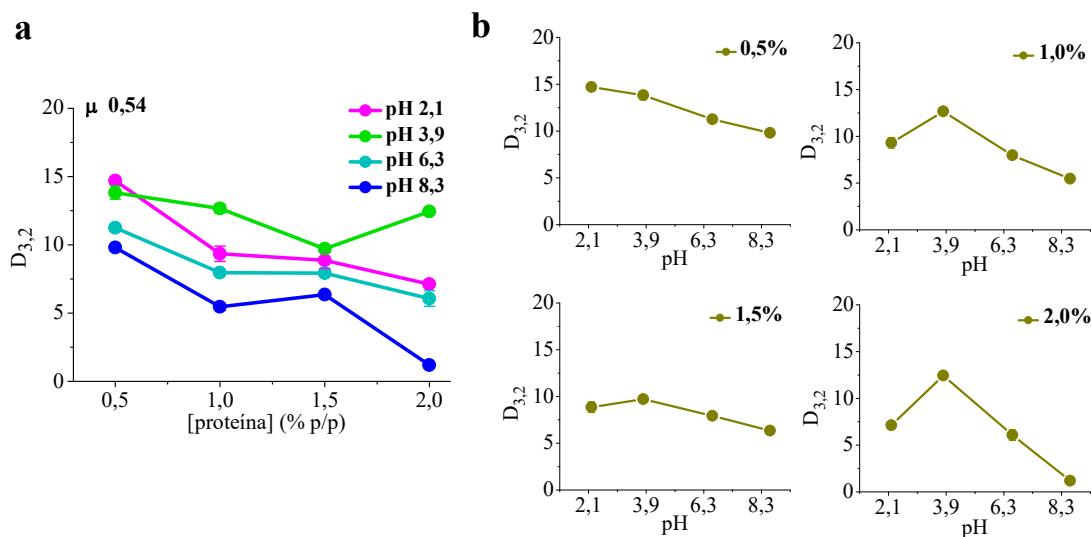


Figura VI.4: Diámetro promedio en superficie ($D_{3,2}$) de emulsiones o/w de A8, **a)** en función de la concentración de proteína; **b)** en función del pH ($\mu = 0,54$).

Los valores de $D_{3,2}$ fueron mayores que los encontrados a baja fuerza iónica, principalmente a pH 2,1 y 8,3. La variación de $D_{3,2}$ al 1,0 y 2,0% p/p en función del pH fue similar a lo encontrado a baja fuerza iónica. Pero esta variación fue menos acentuada al 1,5% p/p, mientras que al 0,5% p/p se observó una disminución continua de $D_{3,2}$ con el aumento del pH.

Al aumentar la fuerza iónica se produjo un desplazamiento en los perfiles de distribución hacia la derecha lo que indica que las gotas formadas son de mayor tamaño (Fig. VI.1), encontrándose un aumento de $D_{4,3}$ (Tabla VI.2). Además de la formación de gotas de mayor tamaño, este comportamiento puede deberse a una mayor interacción entre las gotas que provoca floculación entre ellas y a una mayor coalescencia durante la homogeneización. Estos resultados concuerdan con los encontrados para emulsiones estabilizadas con proteínas de lenteja, arveja y garbanzo a pH 3,0 (Ladjal-Ettoumi y col., 2016) y con proteínas de soja a pH 7,0 (Taha y col., 2019; Tian y col., 2021). La presencia de sales produce el apantallamiento de las superficies cargadas lo cual reduce la repulsión electrostática entre las gotas, altera la organización de las moléculas de agua y, por lo

Capítulo VI

tanto, favorece las interacciones hidrofóbicas entre los grupos no polares de las proteínas (Ladjal-Ettoumi y col., 2016).

Al aumentar la concentración de proteínas, si bien se encontró el mismo comportamiento que a baja fuerza iónica, la disminución de $D_{4,3}$ fue menor, excepto a pH 2,1. Al igual que a baja fuerza iónica, las gotas de menor tamaño se obtuvieron a pH 8,3 y las de mayor tamaño a pH 3,9. La diferencia se encuentra en la polidispersidad del tamaño de las gotas, la cual fue mayor a pH 3,9 a alta fuerza iónica (Tabla VI.2).

Tabla VI.2: Diámetro promedio en volumen ($D_{4,3}$) en ausencia y presencia de SDS de emulsiones o/w de A8 a distinto pH, fuerza iónica y concentración de proteína ($\mu=0,54$).

pH	Proteína % (p/p)	$D_{4,3}$	$D_{4,3}^{SDS}$	Span
2,1	0,5	$31,67 \pm 0,64$ a	$10,35 \pm 0,02$ ab	$1,79 \pm 0,07$ a
3,9		$28,24 \pm 1,19$ b	$10,62 \pm 0,17$ a	$1,54 \pm 0,01$ b
6,3		$24,30 \pm 0,82$ c	$8,50 \pm 0,09$ c	$1,63 \pm 0,01$ b
8,3		$23,18 \pm 0,39$ c	$9,08 \pm 0,93$ bc	$1,84 \pm 0,03$ a
2,1	1,0	$19,55 \pm 0,85$ b	$6,03 \pm 0,00$ b	$1,93 \pm 0,03$ b
3,9		$26,66 \pm 0,76$ a	$5,40 \pm 0,00$ c	$1,72 \pm 0,02$ c
6,3		$18,81 \pm 1,31$ b	$4,74 \pm 0,01$ d	$2,12 \pm 0,07$ a
8,3		$10,40 \pm 0,24$ c	$7,08 \pm 0,03$ a	$1,91 \pm 0,03$ b
2,1	1,5	$17,09 \pm 1,04$ a	$1,94 \pm 0,16$ b	$2,18 \pm 0,02$ b
3,9		$17,74 \pm 0,48$ a	$1,87 \pm 0,00$ b	$2,55 \pm 0,04$ a
6,3		$9,96 \pm 0,11$ b	$1,34 \pm 0,00$ c	$1,34 \pm 0,00$ c
8,3		$7,96 \pm 0,19$ c	$18,90 \pm 0,08$ a	$1,36 \pm 0,01$ c
2,1	2,0	$9,97 \pm 0,10$ b	$14,64 \pm 0,26$ a	$1,73 \pm 0,03$ c
3,9		$23,70 \pm 1,67$ a	$1,36 \pm 0,02$ d	$2,66 \pm 0,35$ a
6,3		$9,34 \pm 3,07$ b	$4,92 \pm 0,22$ c	$1,33 \pm 0,14$ d
8,3		$3,47 \pm 0,10$ c	$13,96 \pm 0,11$ b	$2,21 \pm 0,04$ b

Promedio \pm desvío estándar. Letras distintas en la misma columna para la misma concentración de proteína indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Con la adición de SDS se obtuvieron poblaciones de gota más pequeñas, excepto a pH 2,1 (1,5% p/p) y 8,3 (1,5 y 2,0% p/p) (Fig. VI.5). En estos casos, se generó una población de gotas de mayor tamaño al igual que ocurrió a baja fuerza iónica a pH 2,1 (Fig. VI.3). Este comportamiento también fue informado por Tian y col. (2021) al aumentar la concentración de NaCl para emulsiones de 7S de soja. Además de esto, resulta

interesante destacar que los valores de $[D_{4,3}]_{\text{SDS}}$ a pH 3,9 a alta fuerza iónica resultaron menores que a baja fuerza iónica. Esto indicaría que en condiciones de alta fuerza iónica las gotas formadas son de menor tamaño, probablemente debido a una mayor disponibilidad de proteína soluble (Fig. VI.5).

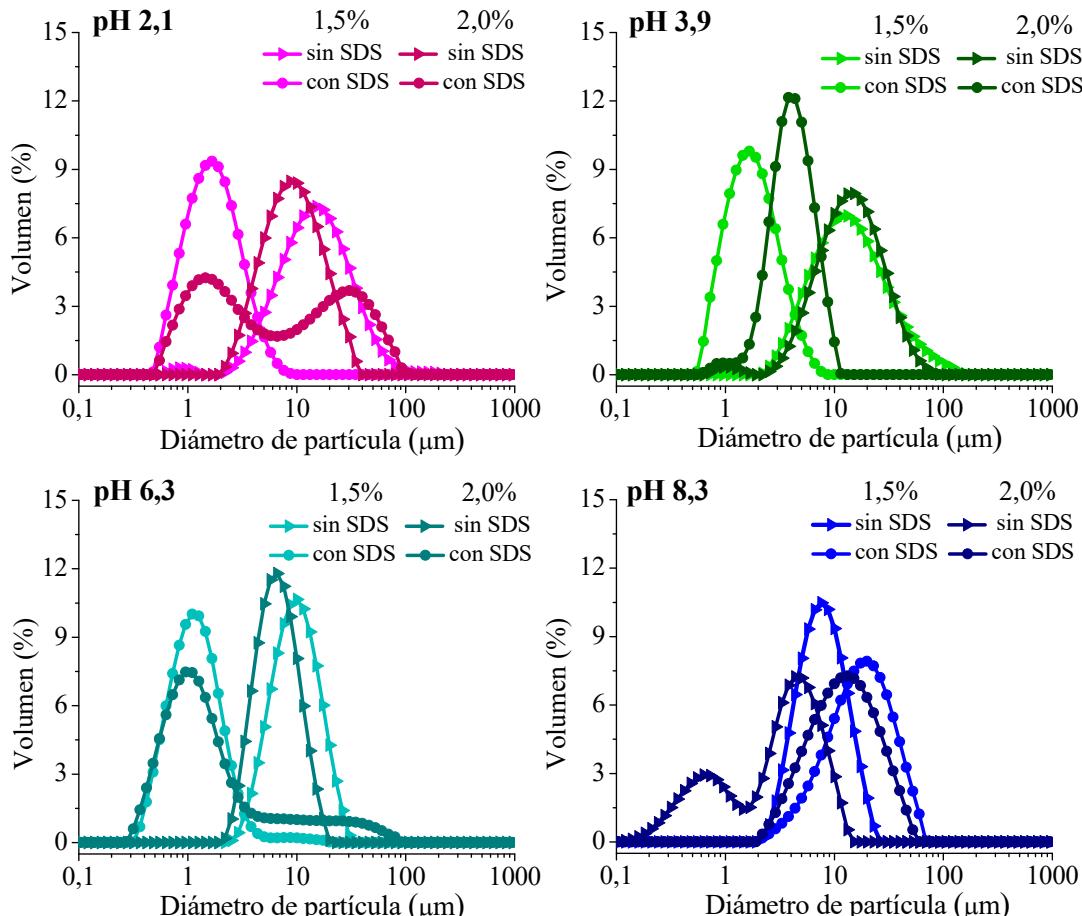


Figura VI.5: Distribución de tamaño de partícula en ausencia y presencia de SDS de las emulsiones o/w de A8 al 1,5 y 2,0% p/p a distintos pH ($\mu = 0,54$).

VI.2. Viscosidad aparente de las emulsiones

La viscosidad de las emulsiones es una característica importante para determinar su estabilidad, por ejemplo, en una emulsión con alta viscosidad el movimiento de las gotas podría verse retardado y, por lo tanto, el proceso de cremado (Xu y col., 2015). Las curvas de flujo de las emulsiones o/w de A8 se presentan en la Figura VI.6. No hubo una correlación entre la concentración de proteína y la viscosidad aparente, excepto para las emulsiones a pH 6,3 ($\mu = 0,10$) y pH 3,9 ($\mu = 0,54$), donde la viscosidad fue mayor con concentraciones de proteína por encima de 0,5% p/p.

Capítulo VI

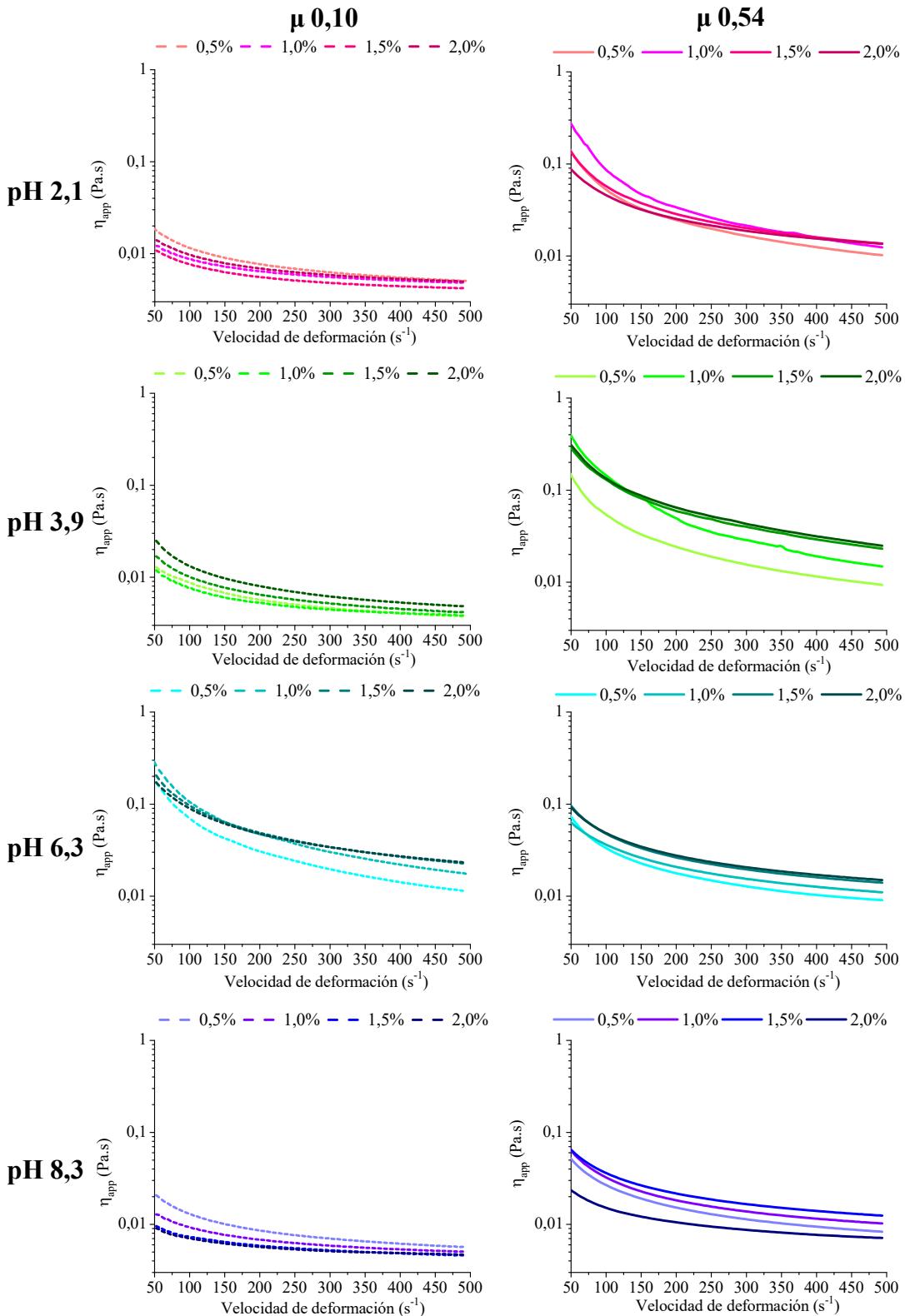


Figura VI.6: Viscosidad aparente (η_{app}) en función de la velocidad de deformación (s^{-1}) de emulsiones o/w de A8 a distinto pH, fuerza iónica y concentración de proteína.

Baja fuerza iónica

A baja fuerza iónica, no hubo diferencias en la viscosidad aparente de las emulsiones con la variación del pH, excepto a pH 6,3, donde los valores obtenidos fueron mayores. Un mayor valor en la viscosidad aparente puede ser consecuencia de la presencia de flóculos que atraparían una cantidad considerable de fase continua entre su estructura, aumentando de esta forma la fracción de volumen efectivo de las gotas (McClements, 2012). Además, las emulsiones a pH 6,3 mostraron una disminución considerable de viscosidad a medida que aumenta la velocidad de cizalla. Este comportamiento es conocido como *shear-thinning*, y puede relacionarse a la presencia de los flóculos formados por gotas unidas débilmente que son particularmente sensibles a la aplicación de un esfuerzo de corte, a medida que aumenta la velocidad de deformación los cúmulos de gotas se van rompiendo y la viscosidad disminuye (McClements, 2016). Del mismo modo, Suarez y Añón (2018) informaron mayor viscosidad aparente a pH 6,3 que a pH 2,0 para emulsiones estabilizadas con dispersiones proteicas de amaranto.

Alta fuerza iónica

Con el aumento de fuerza iónica, hubo un incremento de viscosidad aparente en las emulsiones a pH 2,1, 3,9 y 8,3, este último en menor medida, mientras que a pH 6,3 disminuyó. Un mayor valor en la viscosidad podría relacionarse a una alta capacidad de asociación de las proteínas en determinadas condiciones. Además de las diferencias encontradas, las emulsiones a pH 2,1 y 3,9 presentaron un comportamiento *shear-thinning* al igual que pH 6,3 ($\mu = 0,10$).

VI.3. Microscopía confocal de barrido

Las características microestructurales de las emulsiones o/w de A8 a las distintas concentraciones de proteína y pH se pueden observar en las Figuras VI.7 ($\mu = 0,10$) y VI.8 ($\mu = 0,54$), donde las gotas de aceite se encuentran rodeadas por un film de proteínas teñidas con Rodamina B (color rojo).

Baja fuerza iónica

En las micrografías se puede observar cómo disminuye el tamaño de las gotas con el incremento de la concentración de proteínas, lo cual está de acuerdo con el comportamiento hallado en los perfiles de distribución (Fig. VI.1). Sin embargo, por esta metodología no fueron apreciables diferencias de tamaño en las gotas formadas cuando se utilizaron dispersiones al 1,5 y 2,0% p/p.

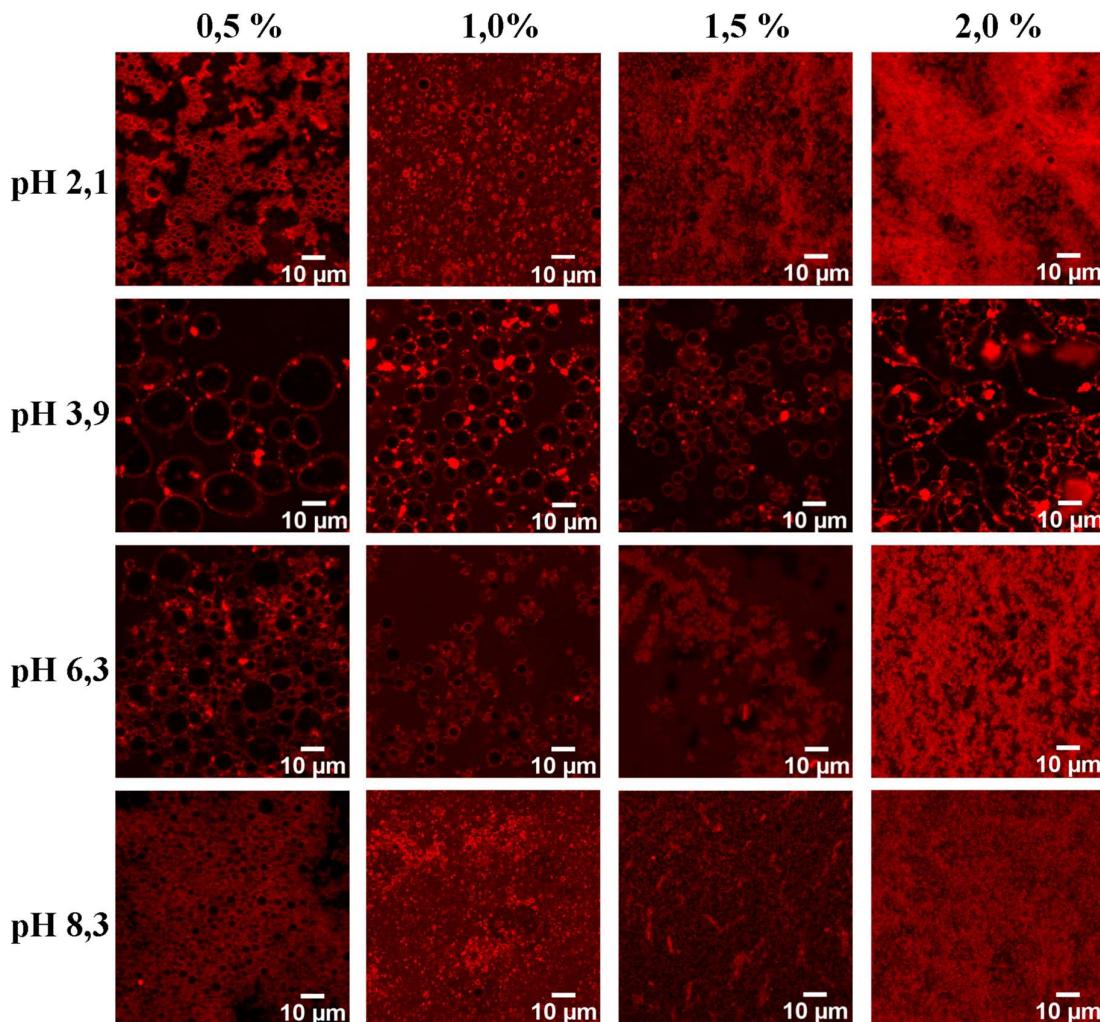


Figura VI.7: Micrografías de las emulsiones o/w de A8 teñidas con Rodamina B a distinto pH y concentración de proteína ($\mu= 0,10$) (63,0X con zoom óptico de 2,5). Escala de la barra = 10 μm .

Las gotas de mayor tamaño se observan a pH 3,9 y las de menor tamaño a pH 8,3, lo cual está de acuerdo con las diferencias de S_0 encontradas. En las micrografías a pH 6,3 se puede inferir la mayor cantidad de proteína no anclada a la interfase debido a la extensión de la tinción con Rodamina B que se visualiza de manera más uniforme en toda la emulsión. Este hecho estaría en relación con la mayor viscosidad aparente encontrada a este pH, la mayor cantidad de proteína insoluble (Fig. V.5) podría contribuir con la mayor resistencia a fluir que presentaron estas emulsiones.

Además, se puede apreciar la presencia de cúmulos de gotas en las distintas emulsiones, lo cual confirma los diferentes grados de floculación encontrados al analizar los resultados de $D_{4,3}$ en ausencia y en presencia de SDS (Tabla VI.1).

Alta fuerza iónica

Con el aumento de la fuerza iónica, disminuye el tamaño de las gotas con el incremento de la concentración de proteínas al igual a lo encontrado a baja fuerza iónica. Comparando los resultados obtenidos, las micrografías confirman el aumento en el tamaño de las gotas, excepto a pH 3,9.

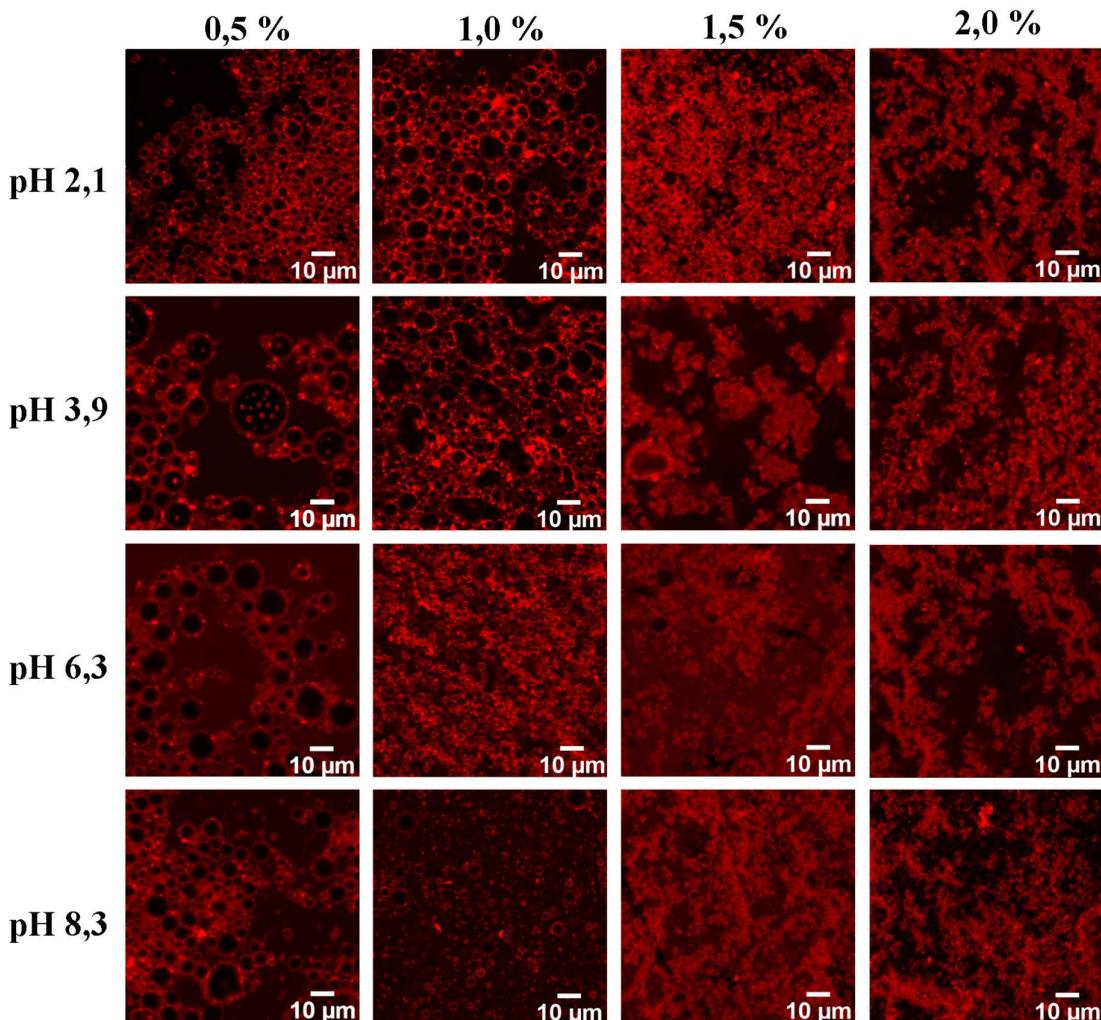


Figura VI.8: Micrografías de las emulsiones o/w de A8 teñidas con Rodamina B a distintos pH y concentración de proteína ($\mu= 0,54$) (63,0X con zoom óptico de 2,5). Escala de la barra = 10 μ m.

Como se mencionó anteriormente, a pH 3,9 los valores de $D_{4,3}$ SDS fueron menores cuando $\mu= 0,54$, lo que implica que las gotas formadas en las emulsiones son más pequeñas, pero tienen mayor tendencia a flocular. Además, a este pH se observa la presencia de emulsiones agua en aceite en agua (w/o/w): pequeñas gotas de agua

Capítulo VI

contenidas en gotas de aceite dispersas en una fase continua acuosa. Este tipo de emulsiones se caracterizan por tener una mayor viscosidad (McClements, 2012), lo cual podría estar relacionado al aumento de viscosidad aparente encontrado a este pH (Fig. VI.5).

VI.4. Índice de floculación e índice de coalescencia

El proceso de floculación se debe a fenómenos de apantallamiento electrostático o a fenómenos asociados con la presencia de especies de alto peso molecular, como proteínas y polisacáridos, que unen la superficie de dos o más gotas que presentan cargas opuestas (McClements, 2016). La dilución y la agitación pueden romper los flóculos débilmente unidos, pero no los fuertemente ligados. En emulsiones floculadas las gotas se agregan en cúmulos muy heterogéneos de diversas formas e índices de refracción, por lo que la distribución de tamaño de partícula da una idea aproximada del verdadero tamaño de los flóculos (Palazolo y col., 2005). El fenómeno de coalescencia ocurre cuando dos o más gotas se fusionan durante el contacto para formar una gota de mayor tamaño. Cuando las emulsiones o/w se preparan utilizando proteínas como único agente emulsificante, en bajas concentraciones y en condiciones de reposo, la coalescencia se vuelve un mecanismo de desestabilización lento comparado con los procesos de floculación y cremado (Britten y Giroux, 1991).

El parámetro $D_{4,3}$ permite detectar los procesos de floculación y coalescencia con mayor sensibilidad que $D_{3,2}$, ya que un gran incremento en $D_{4,3}$ refleja la asociación de las gotas de emulsión en grandes flóculos. A partir de los parámetros $D_{4,3}$ y $D_{4,3}$ SDS se calcularon el índice de floculación (IF) y el índice de coalescencia (IC). Con el agregado de SDS se encontró que las emulsiones o/w de A8 presentaban diferentes grados de floculación. En las Tablas VI.3 y VI.4 se resumen los IF e IC calculados para las emulsiones recién preparadas, a las 24 horas y los siete días de almacenamiento, a baja y alta fuerza iónica, respectivamente.

Además, resulta importante destacar que cuando una emulsión que exhibe floculación por depleción es diluida para realizar una medición, las gotas pueden separarse debido a que la concentración de proteínas no adsorbidas cae por debajo de la concentración crítica de floculación, concentración por debajo de la cual la floculación es débil y reversible. Este fenómeno puede llevar a pensar que la emulsión es estable cuando en realidad se encuentra floculada en un estado normal (McClements, 2016).

Baja fuerza iónica

El IF de las emulsiones recién preparadas se incrementó con el aumento de la concentración de proteína a pH 3,9 y 6,3, mientras que disminuyó a pH 2,1 y 8,3.

Tabla VI.3: Índice de floculación (IF) e índice de coalescencia (IC) de emulsiones o/w de A8 a distinto pH y concentración de proteína ($\mu=0,10$).

Parámetro		IF			IC	
pH	Proteína (% p/p)	Inicial	1 día	7 días	1 día	7 días
2,1	0,5	2,7 ± 0,2bA	3,3 ± 0,7aA	2,0 ± 0,1cA	0,0 ± 0,0aA	0,0 ± 0,0bA
		0,1 ± 0,0cC	0,5 ± 0,0bA	0,4 ± 0,0dB	0,0 ± 0,0aA	0,0 ± 0,0bA
		3,8 ± 0,3aA	4,2 ± 0,9aA	3,6 ± 0,0aA	0,1 ± 0,1aA	0,0 ± 0,0bA
		3,5 ± 0,1aA	4,8 ± 1,6aA	3,2 ± 0,1bA	0,0 ± 0,0aB	0,1 ± 0,0aA
3,9	1,0	0,9 ± 0,2bB	3,5 ± 0,2bA	3,7 ± 0,2aA	-0,6 ± 0,0dA	-0,6 ± 0,0cA
		0,5 ± 0,1bA	0,6 ± 0,1dA	0,6 ± 0,0cA	0,0 ± 0,0bA	0,0 ± 0,0bA
		2,6 ± 0,2aA	2,6 ± 0,1cA	2,5 ± 0,0bA	0,1 ± 0,0aA	0,1 ± 0,0aA
		3,1 ± 0,1aB	4,4 ± 0,2aA	2,8 ± 0,2bB	-0,2 ± 0,0cB	0,0 ± 0,0bA
6,3	1,5	0,9 ± 0,1cB	2,6 ± 0,1bA	-0,4 ± 0,0dC	-0,5 ± 0,0cB	2,0 ± 0,7aA
		2,4 ± 0,2bA	2,2 ± 0,2cA	2,4 ± 0,2bA	0,0 ± 0,0bA	0,0 ± 0,0bA
		6,9 ± 0,4aA	7,4 ± 0,1aA	7,5 ± 0,2aA	0,1 ± 0,0aA	-0,1 ± 0,0cB
		1,2 ± 0,0cB	1,6 ± 0,0dA	1,5 ± 0,2cAB	0,0 ± 0,0bA	0,0 ± 0,0bA
8,3	2,0	-0,6 ± 0,0dA	-0,7 ± 0,0dA	-0,7 ± 0,1cA	0,4 ± 0,0bA	0,4 ± 0,1aA
		3,1 ± 0,2bA	2,7 ± 0,0bB	0,0 ± 0,0bC	2,7 ± 0,0aA	0,0 ± 0,0cB
		6,9 ± 0,4aA	7,1 ± 0,2aA	6,6 ± 0,2aA	0,0 ± 0,0dA	0,0 ± 0,0cA
		0,3 ± 0,0cB	0,3 ± 0,0cB	6,2 ± 0,2aA	0,2 ± 0,0cA	0,1 ± 0,0bB

Promedio ± desvió estándar. Letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$). Letras mayúsculas distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p<0,05$).

A pH 6,3 el aumento de IF podría estar relacionado a su baja So (~50%) (Fig. V.5), y a una mayor presencia de proteína dispersa en la fase continua (Fig. VI.7), esto favorece la floculación de las gotas; o bien a una mayor capacidad de interacción de las proteínas a este pH (Suarez y Añón, 2018). A pH 2,1 y 8,3 la So es mayor y, por lo tanto, mayor es la cantidad de proteína disponible para migrar a la interfase; estas proteínas contribuyen a disminuir el IF mejorando las repulsiones estéricas y electrostáticas entre las gotas (Tian y col., 2021). Ladjal-Ettoumi y col. (2016) informaron una disminución progresiva de IF a

Capítulo VI

pH 3,0 con el aumento de la concentración de proteínas hasta 1,5% p/v, pero obtuvieron el efecto contrario al 2,0% p/v, probablemente promovido por la floculación por depleción.

Considerando la concentración crítica en estas emulsiones (1,5-2,0%) (Fig. VI.2a), la emulsión más floculada se obtuvo a pH 6,3 y la menos floculada a pH 8,3. Suarez y Añón (2018) encontraron mayor IF a pH 6,3 respecto de pH 2,0 para emulsiones estabilizadas con dispersiones proteicas de amaranto al 1,7% p/v, mientras que Tian y col. (2021) describieron un IF muy superior a pH 5,0 que a pH 3,0 y 8,0 para emulsiones de 7S de soja al 1,0% p/v. Ladjal-Ettoumi y col. (2015) encontraron al igual que en nuestro caso, menor IF a pH 8,0 (en un rango de pH de 3,0 a 8,0), sugiriendo además que la variación de IF con el pH dependía del tipo de legumbre analizada (lenteja, arveja y garbanzo).

Analizando el IF durante el almacenamiento, se observó que permaneció constante hasta los siete días en la mayoría de las condiciones ensayadas, excepto a pH 2,1 (1,0% p/p) y 8,3 (2,0% p/p, distribución bimodal) donde hubo un aumento del 300%. Ladjal-Ettoumi y col. (2016) informaron que la variación de IF a las 24 h era dependiente de la concentración de proteína y el tipo de legumbre utilizado. El IC a las 24 horas de almacenamiento (IC_1) presentó valores cercanos a cero, excepto a pH 3,9 (2,0% p/p). A los siete días, IC_7 aumentó únicamente a pH 2,1 (1,5% p/p). Este comportamiento sugiere que, en general, la coalescencia no es un mecanismo de desestabilización importante en las emulsiones o/w de A8 en el tiempo de almacenamiento evaluado.

Alta fuerza iónica

Al aumentar la fuerza iónica, el IF se incrementó con el aumento de la concentración de proteína a pH 2,1, 3,9 y 6,3, y disminuyó a pH 8,3 (Tabla VI.4). El incremento a pH 2,1 puede asociarse no solo a las diferencias de So encontradas (Fig. V.5) sino también a un apantallamiento más efectivo de las cargas en comparación con las proteínas a pH 8,3 debido a diferencias en el valor de potencial Zeta (Fig. V.2).

Con el aumento de fuerza iónica, IF aumentó a pH 2,1 y 3,9, mientras que disminuyó a pH 6,3 y 8,3. Ladjal-Ettoumi y col. (2016) informaron mayor IF al aumentar la concentración de NaCl en emulsiones a pH 3,0 de lenteja, arveja y garbanzo. A pH ácido, con el aumento de la fuerza iónica la carga neta de las gotas disminuye, las proteínas tienen mayor tendencia a agregarse y, como resultado, la emulsión se desestabiliza por fenómenos de floculación (Joye y McClements, 2014; Ladjal-Ettoumi y col., 2016). Considerando el rango de concentración crítica (1,0-1,5% p/p), las emulsiones a pH 3,9

son las más floculadas (Fig. VI.5) mientras que las menos floculadas continúan siendo las obtenidas a pH 8,3.

Tabla VI.4: Índice de floculación (IF) e índice de coalescencia (IC) de emulsiones o/w de A8 a distinto pH y concentración de proteína ($\mu=0,54$).

Parámetro		IF			IC	
pH	Proteína (% p/p)	Inicial	1 día	7 días	1 día	7 días
2,1	0,5	2,1 ± 0,1aA	1,8 ± 0,1bAB	1,5 ± 0,2cB	0,3 ± 0,0bA	0,0 ± 0,0bB
		1,7 ± 0,2aA	0,4 ± 0,1cC	1,1 ± 0,0cB	0,8 ± 0,0aA	0,1 ± 0,0aB
		1,9 ± 0,1aA	2,2 ± 0,2aA	2,4 ± 0,3bA	0,2 ± 0,0cA	0,0 ± 0,0bB
		1,6 ± 0,3aB	2,4 ± 0,2aA	3,1 ± 0,3aA	-0,2 ± 0,0dA	-0,2 ± 0,1cA
2,1	1,0	2,2 ± 0,1cA	2,3 ± 0,1cA	1,8 ± 0,1bB	0,0 ± 0,0bA	0,0 ± 0,0aA
		3,9 ± 0,0aA	4,0 ± 0,2aA	3,3 ± 0,1aB	0,0 ± 0,0bA	0,0 ± 0,0aA
		3,0 ± 0,2bA	3,2 ± 0,1bA	3,3 ± 0,0aA	0,0 ± 0,0bB	0,1 ± 0,0aA
		0,5 ± 0,0dB	-0,2 ± 0,1dC	1,4 ± 0,7bA	1,2 ± 0,0aA	0,0 ± 0,4aB
2,1	1,5	7,8 ± 0,6aA	6,3 ± 0,1aA	6,7 ± 1,0aA	0,2 ± 0,0bA	0,1 ± 0,0bB
		8,5 ± 0,3aA	0,3 ± 0,3bB	8,0 ± 0,4aA	6,1 ± 0,0aA	0,1 ± 0,0bB
		6,4 ± 0,0bA	6,6 ± 0,1aA	0,1 ± 0,1bB	-0,1 ± 0,0dB	5,4 ± 0,0aA
		-0,6 ± 0,0cB	-0,6 ± 0,0cB	0,1 ± 0,2bA	0,1 ± 0,0cA	-0,3 ± 0,0cB
2,1	2,0	-0,3 ± 0,0bB	-0,4 ± 0,0cB	2,1 ± 0,2cA	0,1 ± 0,1aA	-0,8 ± 0,0cB
		16,4 ± 1,3aA	13,3 ± 0,4aB	9,9 ± 1,8aC	-0,1 ± 0,0bB	0,1 ± 0,0aA
		0,9 ± 0,8bB	1,2 ± 0,0bB	5,8 ± 0,1bA	-0,3 ± 0,0dA	-0,8 ± 0,0cB
		-0,8 ± 0,0bB	-0,7 ± 0,0cA	-0,7 ± 0,0bA	-0,2 ± 0,0cB	0,0 ± 0,0bA

Promedio ± desvío estándar. Letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$). Letras mayúsculas distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Considerando la concentración crítica, la variación de IF durante el almacenamiento fue diferente a cada pH. A pH 2,1 y 3,9 y 1,5% p/p de concentración de proteínas, el IF permaneció constante, pero a pH 3,9 y 2,0% p/p disminuyó un 40%. A los siete días, IF₇ disminuyó casi en su totalidad a pH 6,3 (1,5%, p/p) respecto del valor inicial de IF, acompañado de un incremento de IC (IC₇). Las emulsiones preparadas a pH 2,1 (2,0% p/p) y pH 8,3 (1,5% y 2,0% p/p) mostraron un incremento de D_{4,3} SDS y como consecuencia los valores de IF resultaron negativos. En estas emulsiones no se pudo evaluar el comportamiento del IF durante el almacenamiento.

Capítulo VI

El IC₁ presentó una tendencia a mayores valores con respecto a lo encontrado a baja fuerza iónica, aunque en general fue cercano a cero, excepto a pH 3,9 (1,5% p/p) y 8,3 (1,0% p/p). A los siete días, IC₇ aumentó a pH 6,3 (1,5% p/p), pero permaneció constante para la mayoría de las emulsiones obtenidas. Para emulsiones estabilizadas con proteínas de lenteja, arveja y garbanzo a pH 3,0, el IC aumentó considerablemente con el aumento de la fuerza iónica, relacionado a posibles cambios en las propiedades viscoelásticas del film interfacial que acelerarían la desestabilización de las emulsiones (Ladjal-Ettoumi y col., 2016).

El comportamiento encontrado en el IC en este trabajo de tesis, independientemente de la fuerza iónica del medio, sugiere que la coalescencia no es un mecanismo de desestabilización importante en las emulsiones o/w de A8 en el tiempo de almacenamiento analizado.

VI.5. Estabilidad global de las emulsiones

La estabilidad de las emulsiones fue analizada por medio de la variación de backscattering promedio (%BS_{prom}) en la zona baja (10-15 mm) y en la zona alta (40-50 mm) del tubo de medición (Fig. VI.9 y VI.10, respectivamente) (ver ítem III.4.3.1.5, Materiales y métodos). El análisis de los perfiles de %BS_{prom} en función del tiempo permite una evaluación de la desestabilización global de la emulsión 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 y col., 2012; Palazolo y col., 2005; Wang y col., 2018).

Baja fuerza iónica

Los valores de %BS_{prom} iniciales en las emulsiones a pH 2,1 y 8,3 son mayores que los obtenidos para las emulsiones a pH 3,9 y 6,3 (Fig. VI.9), esto guarda relación con lo encontrado en el tamaño de gota (Fig. VI.1, Tabla VI.1) dado que a mayor valor de %BS_{prom} menor es el tamaño de gota promedio (Ventureira, 2010). Durante las primeras cuatro horas de almacenamiento, el %BS_{prom} disminuyó en la zona baja del tubo entre un 53 y 60% respecto del valor inicial en las emulsiones a pH 3,9 y 6,3 (0,5% p/p), además se observó una clarificación del tubo en esta zona. El descenso del %BS_{prom} se produce por una disminución del número de gotas en la parte baja del tubo debido a la migración de las gotas hacia la parte superior. Estas emulsiones resultaron más inestables que aquellas a pH

2,1 y 8,3 (0,5% p/p), donde el %BS_{prom} disminuyó entre un 6 y 18%, en las primeras horas. Al aumentar la concentración de proteína, se obtuvieron emulsiones más estables a pH 2,1, 6,3 y 8,3 a partir de 1,0% p/p, en estas emulsiones la disminución de %BS_{prom} fue menor al 10% durante los siete días de almacenamiento. A pH 3,9, si bien fue menor la variación de %BS_{prom} con el tiempo al aumentar la concentración de proteínas, las emulsiones continuaron siendo inestables en el tiempo de almacenamiento analizado.

El comportamiento obtenido a pH 3,9 está relacionado con la baja So de A8 a este pH (Fig. VI.5), esto lleva a una baja cantidad de proteína disponible para ser adsorbida en la interfase o/w, generándose huecos en las gotas formadas que favorecen la coalescencia. Mediante este fenómeno disminuye el área de contacto entre la fase acuosa y oleosa y la emulsión se mueve hacia un estado termodinámicamente más estable. A pH 2,1 y 8,3, la estabilidad de las emulsiones está relacionada a la mayor So a estos pH, que favorece la formación de gotas más pequeñas (Fig. VI.1, Tabla VI.1), y a la repulsión electrostática entre las gotas que resulta de la carga neta de las proteínas ubicadas en la interfase (Fig. VI.2). Si bien solo se midió el potencial Zeta de las soluciones a los distintos pH, éste se encuentra relacionado con el potencial Zeta de las gotas de las emulsiones como lo sugirieron Tian y col. (2021). Estos autores encontraron que el valor del potencial Zeta de soluciones de proteína 7S de soja eran similares a los valores de las gotas de emulsión obtenidas a partir de estas soluciones. Con respecto a pH 6,3, la estabilidad de las emulsiones podría deberse a la presencia de proteínas dispersas en la fase continua (Fig. VI.7) que promoverían floculación por puenteo dando lugar a la formación de una red. La existencia de esta red se relaciona con el incremento de viscosidad aparente encontrado a este pH (Fig. VI.6), lo cual contribuye al retraso en la migración de las gotas y, por lo tanto, al retraso en el proceso de cremado (Suarez y Añón, 2018). Sin embargo, debido a la relevancia científica e industrial de este tema, futuras investigaciones son requeridas para elucidar los mecanismos involucrados en la estabilidad de estos sistemas.

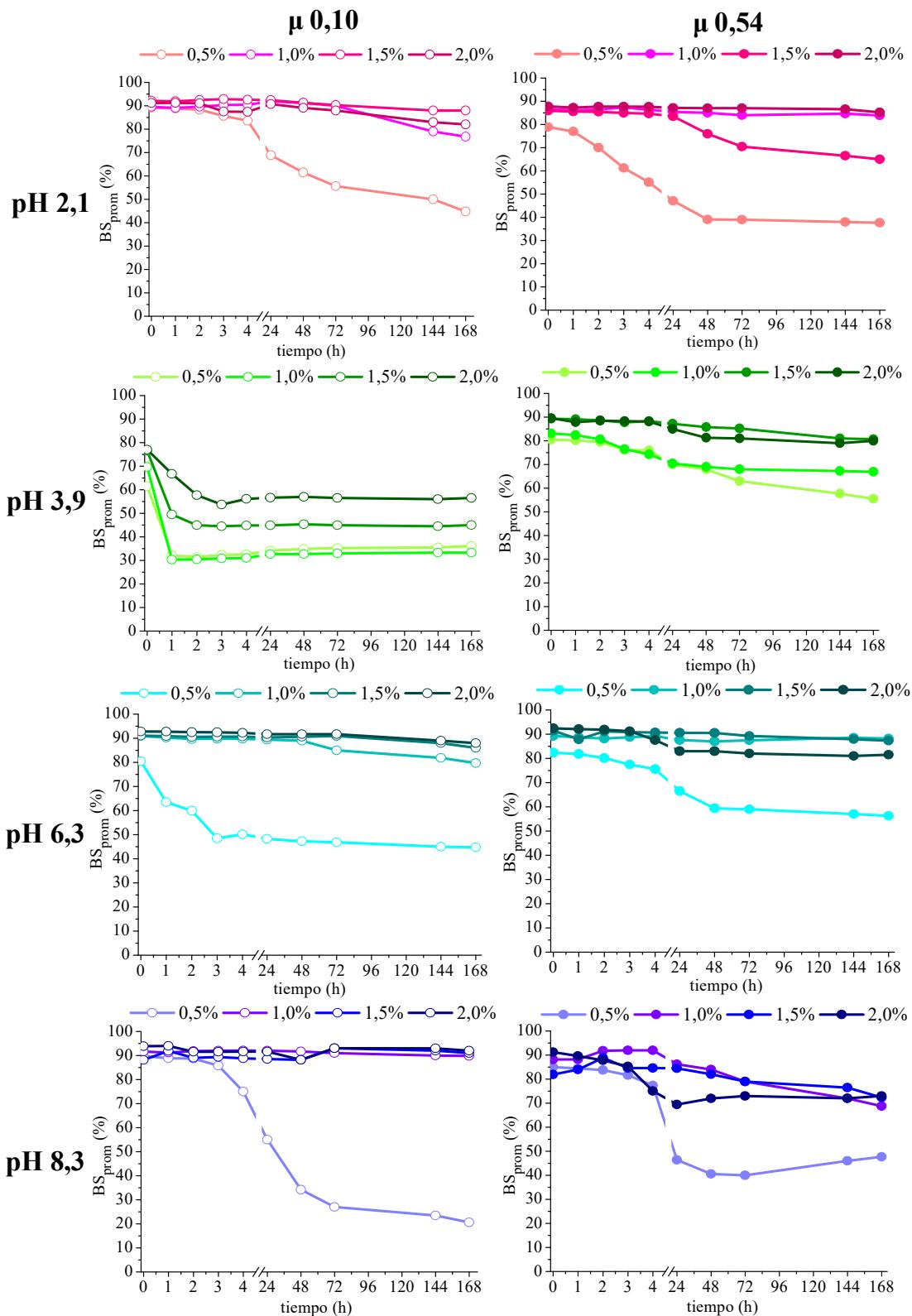


Figura VI.9: Variación de Backscattering promedio (%BS_{prom}) en función del tiempo de emulsiones o/w de A8 a los distintos pH, fuerza iónica y concentración de proteínas. La zona seleccionada para el análisis fue 10-15 mm (cinética de cremado-flocculación).

Resultados similares a los nuestros fueron informados para emulsiones estabilizadas por aislados proteicos de lenteja, arveja y garbanzo en un rango de pH de 3,0-8,0 (Ladjal-Ettoumi y col., 2015) y 7S de soja (Tian y col., 2021), y por aislados proteicos de lenteja y arveja en un rango de pH de 3,0-7,0 (Chang y col., 2015). Mwasaru y col. (2000) informaron una buena capacidad emulsificante a pH 2,0 para aislados proteicos de CC, pero una mejor estabilidad a pH 4,0. Lafarga y col. (2019) encontraron que la capacidad emulsionante de aislados proteicos de varias legumbres y la estabilidad de las emulsiones obtenidas fue mayor en los pH extremos (2,0 y 10,0), aunque a pH intermedios, los aislados proteicos mostraron un cierto potencial para ser utilizados en el desarrollo de emulsiones alimentarias.

Alta fuerza iónica

El efecto del aumento de la fuerza iónica sobre la estabilidad de las emulsiones fue pH dependiente y el cambio más notable fue a pH 3,9, donde la estabilidad mejoró, incluso a bajas concentraciones de proteína (Fig. VI.9). Esto puede deberse a la mayor cantidad de proteína soluble (Fig. V.5) para cubrir el área interfacial, y/o a la mayor viscosidad de estas emulsiones (Fig. VI.6) que disminuye la velocidad de migración de las gotas. El mismo resultado se obtuvo a pH 6,3 al 0,5 % p/p. Las emulsiones a pH 2,1 no presentaron cambios en la estabilidad (1,0 y 2,0% p/p), mientras que a pH 8,3 la estabilidad se vio afectada por la fuerza iónica del medio, hecho que podría relacionarse al aumento del tamaño de las gotas y a la polidispersidad (Fig. VI.1, Tabla VI.2). La disminución de estabilidad de las emulsiones cuando la fuerza iónica del medio es elevada puede atribuirse no solo al apantallamiento de las cargas superficiales de las gotas, sino también a un efecto *salting out*. Las moléculas de agua “prefieren” establecer interacciones fuertes con los iones en lugar de interacciones débiles con biopolímeros hidratados (proteínas) (Salminen y Weiss, 2014). Esto promueve interacciones proteína-proteína y la formación de agregados proteicos, lo que finalmente resulta en una lenta difusión de las proteínas a la interfase o/w en presencia de altas concentraciones de iones (Joshi y col., 2012).

Este comportamiento pH dependiente de la estabilidad de emulsiones preparadas con proteínas de origen vegetal como agente emulsionante, fue informado por otros autores. Mwasaru y col. (2000) encontraron que las emulsiones preparadas con proteínas de CC fueron más estables a pH 4,0 y menos estables a pH 8,0, a bajas concentraciones de NaCl (0,1-0,2 M) y, con el aumento de concentración de NaCl, las emulsiones resultaron más estables a pH 2,0. Joshi y col. (2012) encontraron una disminución del índice de

Capítulo VI

estabilidad emulsionante al aumentar la concentración de NaCl de 0 a 1 M en emulsiones de aislado proteico de lenteja a pH 7,0, y Tian y col. (2021) describieron un efecto negativo en la actividad emulsionante de 7S de soja al aumentar la fuerza iónica del medio promovido por un aumento en la agregación de las gotas. Otros autores informaron incrementos en el Índice de cremado al aumentar la concentración de NaCl en emulsiones de lenteja, arveja y garbanzo a pH 3,0 (Ladjal-Ettoumi y col., 2016) y de soja a pH 7,0 (Taha y col., 2019).

Además, se analizó la variación del %BS_{prom} en la parte superior del tubo de medida (40-50 mm). Estas cinéticas están representadas en la Figura VI.10. La crema se va acumulando en la parte alta del tubo por acción de la gravedad. En la figura se puede observar que, en general, no se ha encontrado variación de %BS en la zona alta del tubo en todas las condiciones ensayadas, excepto a pH 3,9 ($\mu= 0,10$; 0,5% p/p) donde el %BS_{prom} aumentó 10% a los 6 días de almacenamiento. La elevada estabilidad frente al cremado de estas emulsiones durante el tiempo analizado puede estar asociada a la formación de una red de flóculos que retrasaría el movimiento de las gotas y, por lo tanto, el cremado y la coalescencia.

La acumulación de gotas en la fase crema favorece la coalescencia debido a que la distancia entre gotas es menor y su empaquetamiento es mayor. La disminución del %BS_{prom} en la zona alta del tubo se asocia a un menor número de partículas, lo cual puede estar relacionado con fenómenos de coalescencia y/o flocculación que llevan a la desestabilización de la fase crema (Palazolo y col., 2005). En general, en las emulsiones o/w de A8 esta disminución no es apreciable en el tiempo de almacenamiento ensayado (Fig. VI.10).

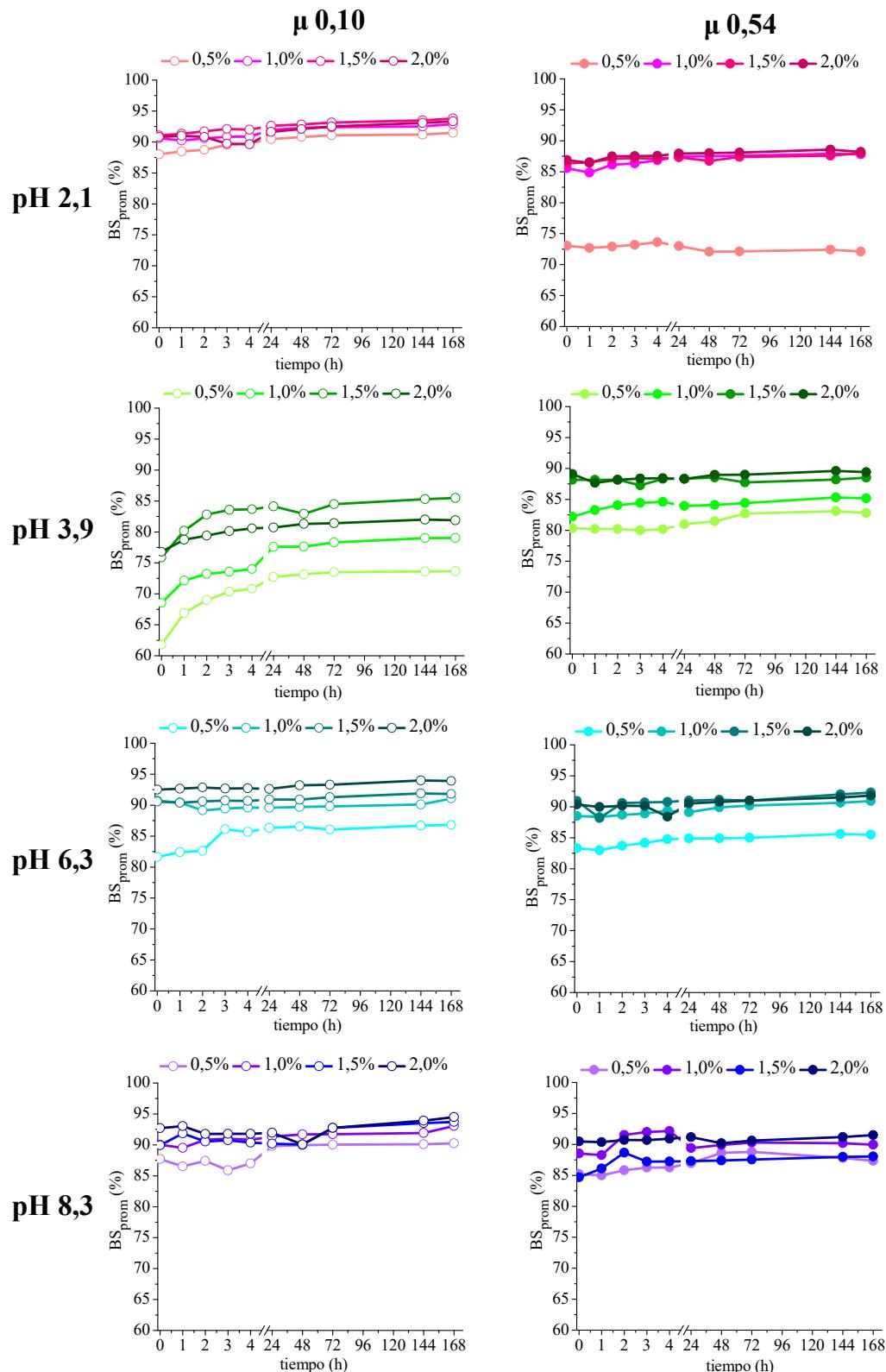


Figura VI.10: Variación de Backscattering promedio (%BS_{prom}) en función del tiempo de emulsiones o/w de A8 a distinto pH, fuerza iónica y concentración de proteínas. La zona seleccionada para el análisis fue 40-50 mm (cinética de floculación-coalescencia).

VI.6. Conclusiones parciales

Se lograron obtener emulsiones o/w utilizando dispersiones de A8 como emulsificante en las distintas condiciones de pH y fuerza iónica. La mayoría de las emulsiones mostraron una distribución monomodal de tamaño, excepto a pH 8,3 al 2,0% p/p ($\mu= 0,54$), donde se encontró una distribución bimodal. Las emulsiones a pH 8,3 presentaron las gotas más pequeñas mientras que las gotas de mayor tamaño se encontraron a pH 3,9, independientemente de la fuerza iónica del medio. En general, con el aumento de la fuerza iónica el tamaño de las gotas se incrementó, y las emulsiones a pH 6,3 presentaron las menores modificaciones. De acuerdo con los valores de $D_{3,2}$, la concentración crítica de proteínas fue diferente de acuerdo con el pH y la fuerza iónica de la emulsión, y varió entre 1,5 y 2,0% p/p a baja fuerza iónica mientras que se encontró entre 1,0 y 1,5% p/p a alta fuerza iónica.

Las emulsiones más viscosas fueron las emulsiones a pH 6,3 ($\mu= 0,10$) y pH 2,1 y 3,9 ($\mu= 0,54$). Considerando la concentración crítica encontrada, estas emulsiones se caracterizaron por tener mayor IF. Las emulsiones menos floculadas fueron las obtenidas a pH 8,3. El IF de las emulsiones permanecieron constantes hasta los 7 días de almacenamiento, excepto a pH 2,1 (1,0% p/p) y pH 8,3 (2,0% p/p).

A baja fuerza iónica, se obtuvieron emulsiones estables en el tiempo de almacenamiento analizado a pH 2,1, 6,3 y 8,3 cuando la concentración de proteínas fue $\geq 1,0\%$ p/p, a pesar de las diferencias encontradas en el tamaño de partícula, viscosidad e IF. Al aumentar la fuerza iónica, la estabilidad de la emulsión fue pH dependiente. El cambio más notable se obtuvo en las emulsiones a pH 3,9, donde la estabilidad fue mejorada incluso a bajas concentraciones de proteína.

Si bien la mayoría de las emulsiones presentaron floculación, en muchas de las emulsiones la presencia de flóculos favoreció su estabilidad durante los siete días de almacenamiento estudiados. Fenómenos de coalescencia fueron evidentes a pH 3,9 a baja fuerza iónica, relacionados principalmente a la baja So de las proteínas de A8 en estas condiciones.

Capítulo VII

Propiedades superficiales –

Propiedades Espumantes

En este capítulo se evalúan las propiedades espumantes del aislado A8 en función del pH y la fuerza iónica, para lo cual se ensayaron dos concentraciones de proteína (0,1 y 0,5% p/p). El estudio de las propiedades espumantes se puede separar en dos etapas básicas. Por un lado, el análisis de la capacidad de formación de la espuma y, por el otro, el correspondiente a la estabilidad de la misma. Esta división resulta compleja debido a la pronta desestabilización de la espuma (Halling y Walstra, 1981; Salager y col., 2003), a medida que se va formando la espuma, simultáneamente se va desestabilizando la que ya está formada.

VII.1. Capacidad de formación de espuma

La capacidad de formación de espuma se evaluó mediante distintos parámetros. Durante el burbujeo se evaluó la velocidad máxima de incorporación de líquido en la espuma (v_0). Al finalizar el burbujeo se determinó el volumen de líquido incorporado en la espuma (V_{LE}), el volumen de espuma (V_{esp}) y, relacionando estos dos parámetros, la densidad de la espuma (δ_{esp}). En la Figura VII.1 se resume el volumen de líquido incorporado en la espuma en función del tiempo para todas las muestras ensayadas.

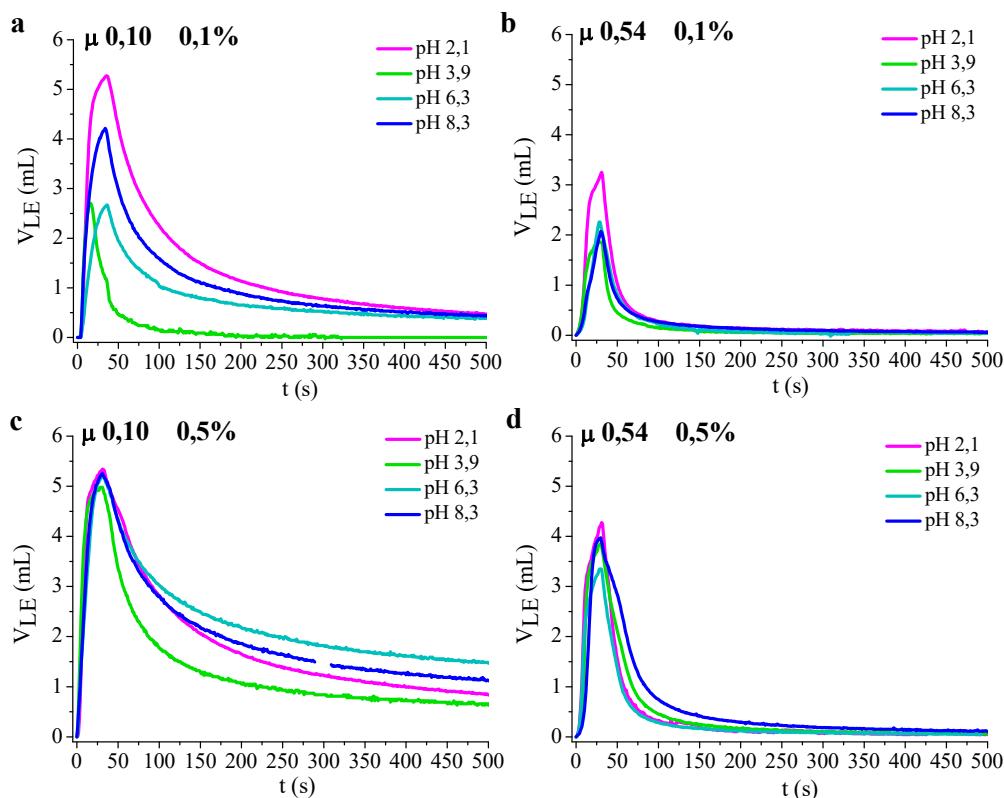


Figura VII.1: Volumen de líquido incorporado (V_{LE}) en la espuma en función del tiempo a distinto pH, fuerza iónica y concentración de proteína.

Capítulo VII

A baja fuerza iónica, las espumas preparadas a los pH extremos incorporaron mayor cantidad de líquido, pero con el aumento de la concentración proteica no se registró esta diferencia entre los pH estudiados (Fig. VII.1a y 1c). Al aumentar la fuerza iónica (Fig. VII.1b y 1d), las espumas incorporaron menor volumen de líquido y su descenso ocurrió más rápidamente, lo que estaría indicando que las burbujas formadas tienden a colapsar en menor tiempo en comparación a las obtenidas a baja fuerza iónica.

Baja fuerza iónica

La velocidad de incorporación de líquido a las espumas es comúnmente utilizada como medida de la capacidad espumante de las proteínas, así a mayor velocidad mejor la capacidad espumante (Bolontrade y col., 2013). En la Figura VII.2 se muestran los valores correspondientes a la velocidad máxima de incorporación de líquido a la espuma (v_0). Al 0,1% p/p, puede observarse que v_0 es mayor a los pH que se encuentran por debajo del pI de A8 respecto de los pH por encima del pI ($p<0,05$). Este comportamiento podría relacionarse al hecho de que las proteínas a pH 2,1 y 3,9 se encuentran más desnaturadas (Tabla V.1) y desplegadas (Fig. V.3a), lo cual facilitaría su ubicación en la interfase a/w. Al aumentar la concentración de proteína a 0,5% p/p, v_0 aumentó a todos los pH estudiados, excepto a pH 2,1, y los valores de v_0 resultaron más cercanos entre sí.

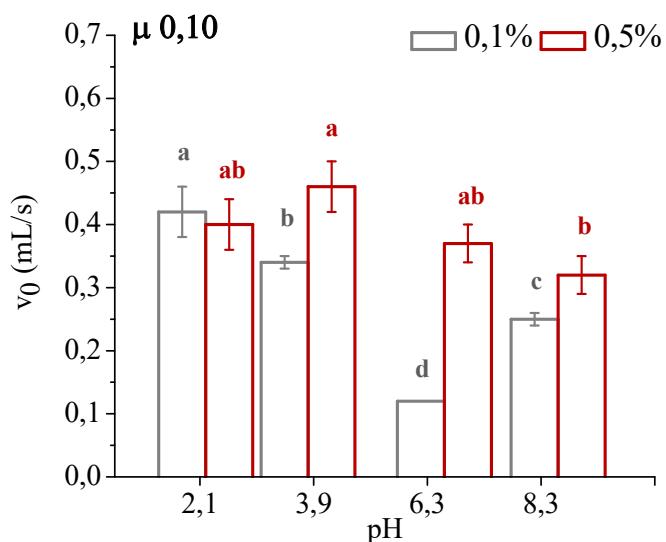


Figura VII.2: Velocidad máxima de incorporación de líquido a la espuma (v_0) en función del pH del medio al 0,1 y 0,5% p/p de proteína ($\mu= 0,10$). Letras distintas para cada concentración de proteína indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Se calculó el volumen de líquido incorporado a la espuma al finalizar el burbujeo (V_{LE}). En todos los casos, este volumen coincide con el volumen máximo incorporado a la

espuma, excepto a pH 3,9 al 0,1% p/p. En este caso, el volumen máximo se obtuvo a los 12 segundos de iniciado el burbujeo luego de lo cual comenzó a descender, esto indica que los procesos de desestabilización ocurren a una mayor velocidad que la formación de la espuma en estas condiciones. En la Figura VII.3a se muestran los valores de V_{LE} obtenidos para las dos concentraciones de proteína. Al 0,1% p/p, el V_{LE} fue mayor a pH 2,1, mientras que las espumas obtenidas con las dispersiones a pH 3,9 incorporaron la menor cantidad de líquido. El comportamiento a pH 3,9 es contrario a lo que se esperaba teniendo en cuenta los valores de γ_{eq} para la interfase a/w (Tabla V.3) y v_0 (Fig. VII.2), sin embargo los resultados encontrados podrían explicarse por la baja So de A8 a este pH (Fig. V.5). Al 0,5% p/p, hubo un aumento de V_{LE} a todos los pH, excepto a pH 2,1, y no se observaron diferencias significativas entre los pH. Distintos investigadores han demostrado que la capacidad espumante de las proteínas aumenta con el incremento de su concentración en la solución de espumado (Carrera-Sánchez y Rodríguez-Patino, 2005).

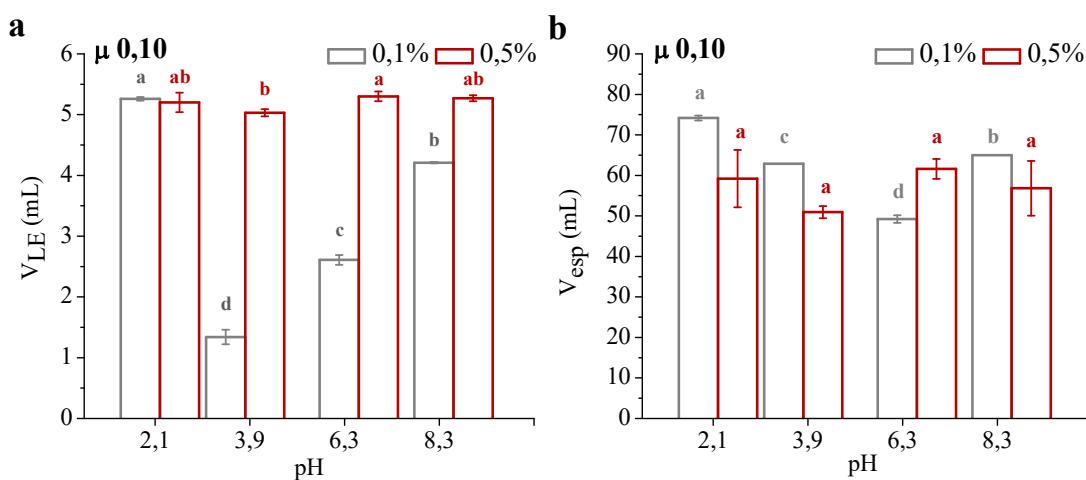


Figura VII.3: a) Volumen de líquido incorporado a la espuma (V_{LE}), y b) volumen de espuma (V_{esp}) en función del pH al 0,1 y 0,5% p/p de proteína ($\mu= 0,10$). Letras distintas para cada concentración de proteína indican diferencias significativas ($p<0,05$).

En la Figura VII.3b se presentan los valores calculados de V_{esp} . En general, se observa la misma tendencia que para V_{LE} con la diferencia en que al aumentar la concentración de proteína, V_{esp} aumentó a pH 6,3, disminuyó a pH 2,1 y 3,9 y permaneció constante a pH 8,3.

Por último, se calcularon los valores de δ_{esp} a partir de la relación V_{LE}/V_{esp} , los mismos se presentan en la Figura VII.4. Cuando se utilizó una concentración de 0,1% p/p, las espumas más densas se obtuvieron a pH 2,1 y las menos densas a pH 3,9. Al 0,5% p/p,

Capítulo VII

todas las espumas presentaron mayor densidad y su valor fue independiente del pH, este comportamiento se encuentra en relación con lo obtenido tanto para V_{LE} como V_{esp} .

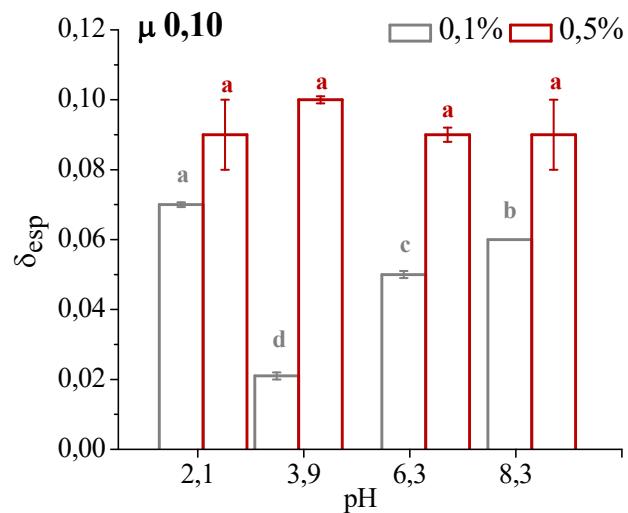


Figura VII.4: Densidad de la espuma (δ_{esp}) en función del pH al 0,1 y 0,5% p/p de proteína ($\mu= 0,10$). Letras distintas para cada concentración de proteína indican diferencias significativas ($p<0,05$).

En la Figura VII.5 se presentan fotografías de las espumas obtenidas al finalizar el burbujeo. Las espumas preparadas con las dispersiones al 0,1% p/p a pH 2,1 y 8,3 estaban formadas por burbujas más pequeñas, más esféricas y de aspecto más homogéneo que las obtenidas a pH 3,9 y 6,3.

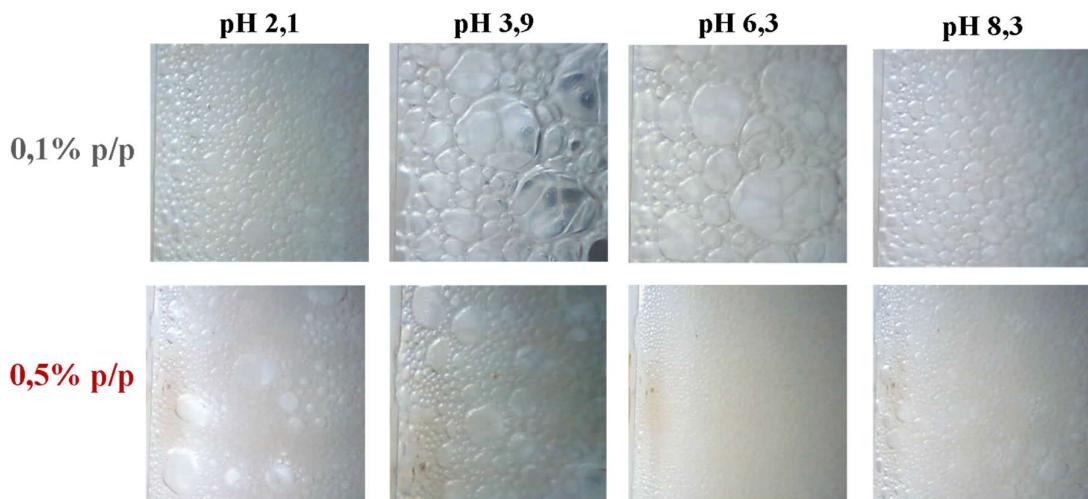


Figura VII.5: Fotografías de las espumas obtenidas a distintos pH y concentración de proteína al finalizar el burbujeo ($\mu= 0,10$).

Al 0,5% p/p, el tamaño de las burbujas disminuyó a todos los pH, pero la polidispersidad en el tamaño aumentó a pH 2,1 y 8,3. Este último efecto no se observó a pH 6,3, donde las burbujas presentaron uniformidad de tamaño. El menor tamaño de las burbujas observadas a 0,5% p/p se traduce en una mayor relación área/volumen, esto permitiría un mayor alojamiento de líquido lamelar, contribuyendo al incremento de V_{LE} y, por lo tanto, a la densidad de la espuma (Bolontrade y col., 2013), lo cual fue observado en las Figuras VII.3a y VII.4.

Teniendo en cuenta los resultados hasta aquí expuestos, la capacidad espumante de las proteínas de A8 se vio afectada por el pH del medio cuando se utiliza 0,1% p/p de proteína, encontrándose una mejor capacidad de formación de espuma a pH 2,1 y la más baja a pH 3,9, cercano al pI de estas proteínas. En cambio, la capacidad espumante sería independiente del pH cuando la concentración de proteína aumenta a 0,5% p/p, a pesar de las diferencias encontradas en el tamaño y forma de las burbujas presentes en cada espuma.

Los resultados encontrados a baja concentración de proteínas son similares a los informados por Mwasaru y col. (2000), quienes obtuvieron espumas mediante batido a partir de suspensiones al 1,0% p/v de aislados proteicos de CC y encontraron que la capacidad espumante fue mayor a pH 2,0 y más baja a pH 4,0 en un rango de pH de 2,0-8,0, relacionado a la So de las proteínas en estos pH. Ge y col. (2021) analizaron aislados proteicos de *Cicer arietinum*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Vigna radiata*, *Vigna unguiculata* y *Vigna angularis* en un rango de pH de 3,0-9,0 e informaron que la capacidad espumante más baja fue a pH 5,0, coincidiendo con la menor So de las proteínas, y los mejores resultados se obtuvieron a pH 3,0 (1,0% p/v, espumas generadas mediante ultraturrax). Resultados similares también fueron informados para aislados proteicos de caupí (Khalid y Elhardallou, 2015).

Alta fuerza iónica

En la Figura VII.6 se muestran los valores encontrados para v_0 al aumentar la fuerza iónica del medio. En la mayoría de los casos, v_0 disminuyó con respecto a los valores encontrados a baja fuerza iónica. Esto podría estar en relación con la menor disminución de γ_{eq} cuando $\mu = 0,54$ (Tabla V.3) y a que las moléculas de proteína tienen una estructura más compacta (Fig. V.3b y V.4b) lo que le conferiría una menor flexibilidad y retardaría la formación de la capa proteica en la interfase. Al igual que lo encontrado a baja fuerza iónica, v_0 aumentó con el aumento de la concentración de proteína, sin embargo

Capítulo VII

los valores continuaron siendo inferiores. En ambas concentraciones de proteína, v_0 fue mayor a pH 2,1.

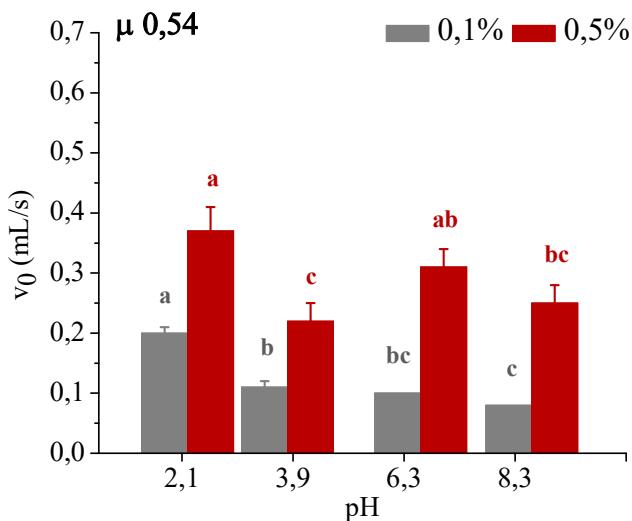


Figura VII.6: Velocidad máxima de incorporación de líquido a la espuma (v_0) en función del pH del medio al 0,1 y 0,5% p/p de proteína ($\mu= 0,54$). Letras distintas para cada concentración de proteína indican diferencias significativas ($p<0,05$).

A diferencia de nuestros resultados, Bolontrade y col. (2013) informaron valores mayores de v_0 con el aumento de fuerza iónica para espumas obtenidas a partir de aislado proteico de amaranto a pH 2,0 y 8,0

Además, se calcularon los valores de V_{LE} y V_{esp} para estas espumas, los cuales se presentan en Figura VII.7a y 7b. V_{LE} disminuyó en todos los casos respecto de baja fuerza iónica, excepto a pH 3,9 al 0,1% p/p, donde la espuma continuó incorporando líquido hasta el cese del burbujeo. Este hecho puede atribuirse a la mayor So de A8 al aumentar la fuerza iónica (Fig. V.5), mejorando su capacidad espumante. Los resultados obtenidos para V_{LE} concuerdan con el comportamiento descripto para v_0 , lo cual corrobora que la magnitud del volumen de líquido incorporado a las espumas se ve influenciado por v_0 (Ventureira, 2010). Al 0,1% p/p, las espumas incorporaron mayor volumen de líquido a pH 2,1; al 0,5% p/p todas las espumas incorporaron mayor volumen de líquido y los valores de V_{LE} para las espumas a pH 2,1 y 8,3 no presentaron diferencias significativas entre sí ($p\geq 0,05$).

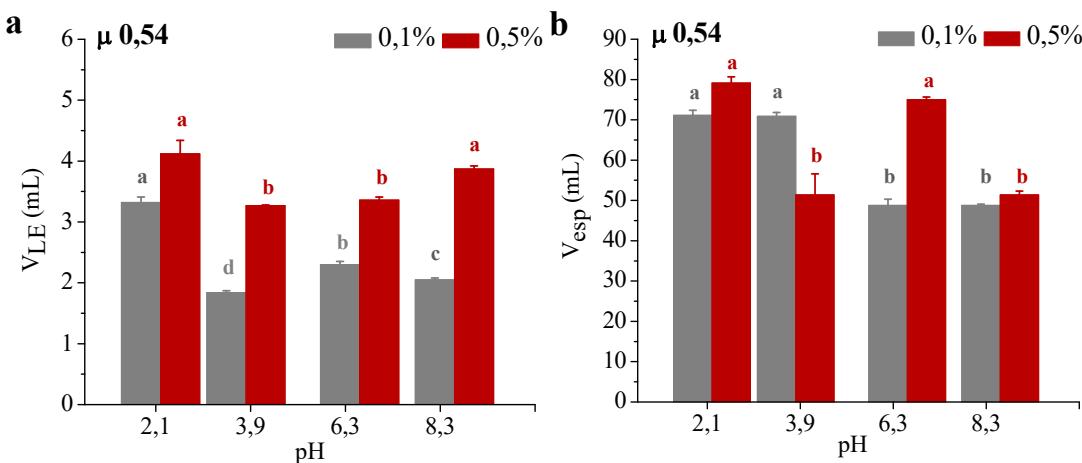


Figura VII.7: a) Volumen de líquido incorporado a la espuma (V_{LE}), y b) volumen de espuma (V_{esp}) en función del pH al 0,1 y 0,5% p/p de proteína ($\mu = 0,54$). Letras distintas para cada concentración de proteína indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Al comparar los valores de V_{esp} a baja fuerza iónica (Fig. VII.3b) y los obtenidos al aumentar la fuerza iónica del medio, no hubo una tendencia clara y su comportamiento fue particular para cada pH y concentración de proteína. Sin embargo, se observó que al 0,1% p/p el V_{esp} fue mayor para las espumas a pH 2,1 y 3,9, mientras que al 0,5% p/p los valores más altos se encontraron a pH 2,1 y 6,3.

De la relación de V_{LE}/V_{esp} se halló la δ_{esp} de las espumas (Fig. VII.8). En la mayoría de los casos, las espumas a alta fuerza iónica fueron menos densas que las obtenidas a baja fuerza iónica, lo cual estaría relacionado con el menor V_{LE} de estas espumas. Al 0,1% p/p, la δ_{esp} solo fue diferente para la espuma a pH 3,9. Al aumentar la concentración de proteína, la δ_{esp} permaneció igual a pH 2,1 y 6,3 mientras que aumentó a pH 3,9 y 8,3. Nuestros resultados fueron diferentes a los informados por Bolontrade y col. (2013), quienes no encontraron diferencias en la δ_{esp} de las espumas de amaranto al variar la fuerza iónica del medio a pH 2,0 y pH 8,0, probablemente relacionado con la similitud de los valores encontrados para V_{LE} en estas muestras.

Capítulo VII

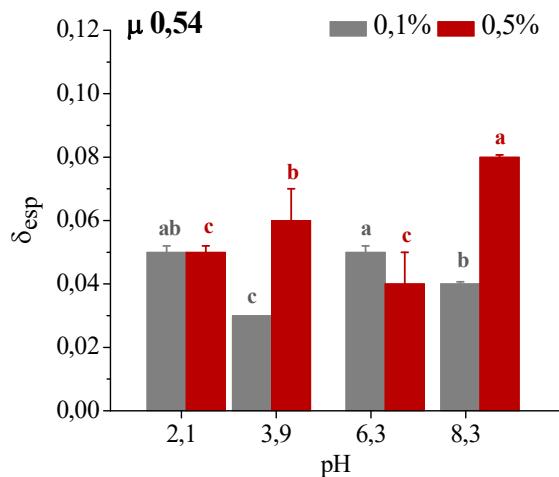


Figura VII.8: Densidad de la espuma (δ_{esp}) en función del pH del medio al 0,1 y 0,5% p/p de proteína ($\mu = 0,54$). Letras distintas para cada concentración de proteína indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En la Figura VII.9 se observan las espumas obtenidas al finalizar el burbujeo. Con el aumento de la fuerza iónica, se encontró un aumento en el tamaño de las burbujas a pH 2,1 y 6,3, con mayor grado de heterogeneidad a las dos concentraciones ensayadas. A pH 6,3 (0,1% p/p) las burbujas más grandes perdieron su forma esférica. A pH 3,9 y 8,3 se observaron comportamientos diferentes con el aumento de fuerza iónica, dependiendo de la concentración de proteína utilizada. A pH 3,9 y 0,1% p/p se mejora la capacidad espumante por el aumento de la fuerza iónica y se obtiene una espuma con mayor estructura, lo cual se verifica visualmente; mientras que al 0,5% p/p la espuma es menos homogénea respecto a lo observado a baja fuerza iónica. A pH 8,3 (0,1% p/p), la espuma presentó una distribución más homogénea con burbujas de tamaño más pequeño que las observadas a baja fuerza iónica; al aumentar la concentración de proteínas el tamaño de las burbujas aumentó, al igual que la heterogeneidad en su tamaño. La presencia de burbujas de mayor tamaño en la mayoría de las espumas se encuentra directamente relacionada con la menor densidad encontrada (Fig. VII.8).

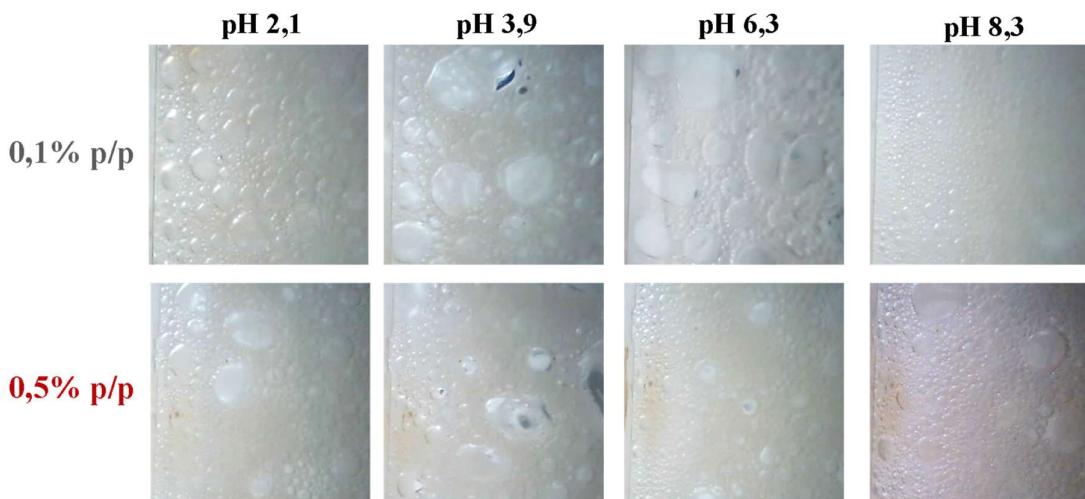


Figura VII.9: Fotografías de las espumas obtenidas a distinto pH y concentración de proteína al finalizar el burbujeo ($\mu= 0,54$).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos del conjunto de parámetros evaluados, la capacidad de formación de espuma de las proteínas de A8 en todo el rango de pH estudiado empeora con el incremento de la fuerza iónica. Sin embargo, este comportamiento fue diferente a pH 3,9 cuando la concentración de proteína fue 0,1% p/p, mejorando la capacidad espumante de A8.

Aunque la metodología utilizada para la obtención de espumas fue diferente, Piornos y col. (2015) informaron un comportamiento equivalente al hallado en esta tesis en proteínas de *Lupinus luteus* al aumentar la fuerza iónica del medio (disminución de la capacidad espumante). Por el contrario, Mwasaru y col. (2000) y Völp y col. (2021) informaron que la capacidad espumante de aislados proteicos de CC, *Vigna unguiculata* y *Lupinus angustifolius* mejoraba progresivamente con el aumento de NaCl.

VII.2. Estabilidad de la espuma

La estabilidad de la espuma es particularmente importante en sistemas alimentarios, donde los productos basados en espumas deben procesarse durante mucho tiempo y las espumas deben preservar su estructura aireada antes de solidificar o gelificarse, por ejemplo, para helados y *mousse* (Ge y col., 2021). Los parámetros utilizados para el análisis de la estabilidad de las espumas fueron el tiempo medio de drenado de líquido de la espuma ($t_{1/2}$) y el volumen de líquido remanente en la espuma a los 8 min (V_8).

Capítulo VII

Baja fuerza iónica

En la Figura VII.10a y 10b se presentan los parámetros $t_{1/2}$ y V_8 para las espumas cuando la fuerza iónica del medio es baja. Al 0,1% p/p, el mayor valor de $t_{1/2}$ se obtuvo a pH 2,1, mientras que los valores a pH 6,3 y 8,3 fueron similares entre sí. El valor de $t_{1/2}$ a pH 3,9 no pudo calcularse debido a que el 50% del líquido incorporado drenó antes del cese del burbujeo. Con el aumento de la concentración de proteína, se pudo observar un incremento de $t_{1/2}$ en todo el rango de pH. Al 0,5% p/p, el menor valor se encontró a pH 3,9, mientras que no hubo diferencias significativas entre pH 2,1, 6,3 y 8,3. Una mayor estabilidad de las espumas se relaciona con la presencia de films interfaciales más fuertes que contribuirían a disminuir el drenado del líquido (Ge y col., 2021).

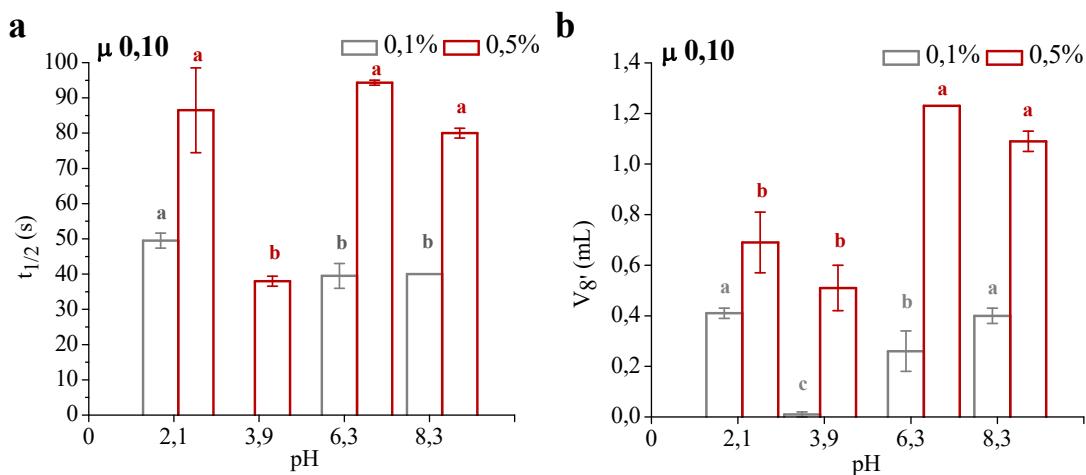


Figura VII.10: a) Tiempo medio de la espuma ($t_{1/2}$) y b) Volumen de líquido remanente en la espuma a los 8 minutos del cese del burbujeo (V_8) en función del pH al 0,1 y 0,5% p/p de proteína ($\mu=0,10$). Letras distintas para cada concentración de proteína indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Con respecto al parámetro V_8 (Fig. VII.10b), éste fue similar a pH 2,1 y 8,3 al 0,1% p/p ($p\geq 0,05$). Sin embargo, con el aumento de la concentración de proteína V_8 aumentó en todas las condiciones de pH, lo que implica que las espumas retuvieron mayor cantidad de líquido en el tiempo analizado, especialmente a pH 6,3 y 8,3. Asimismo a pH 3,9, el drenado de líquido fue relativamente rápido, pero con una mejora en la retención de volumen de la espuma en el tiempo. Esto podría deberse a la presencia de agregados proteicos adsorbidos en la interfase que reforzarían el film interfacial. Además, Völp y col. (2021) informaron que la presencia de precipitados proteicos promueve la estabilidad de la espuma al bloquear los bordes de *Plateau*, impidiendo el drenado del líquido.

En la Figura VII.11 se presentan las fotografías de las espumas al 0,1% p/p al final del burbujeo ($t= 0$ s) y su evolución en el tiempo durante 8 minutos ($t= 500$ s). A pH 2,1 la espuma se mantuvo estructurada hasta los 8 min; a pH 8,3 el comportamiento fue similar, aunque al final del tiempo analizado las burbujas adoptaron una forma poliédrica. A pH 3,9 y 6,3, las espumas obtenidas se desestabilizaron rápidamente y a los 8 min colapsaron casi en su totalidad, lo cual está relacionado con los valores de $t_{1/2}$ y V_8 obtenidos. Las burbujas que se observan en $t= 500$ s son restos de espuma que quedaron adheridos a la pared de la columna.

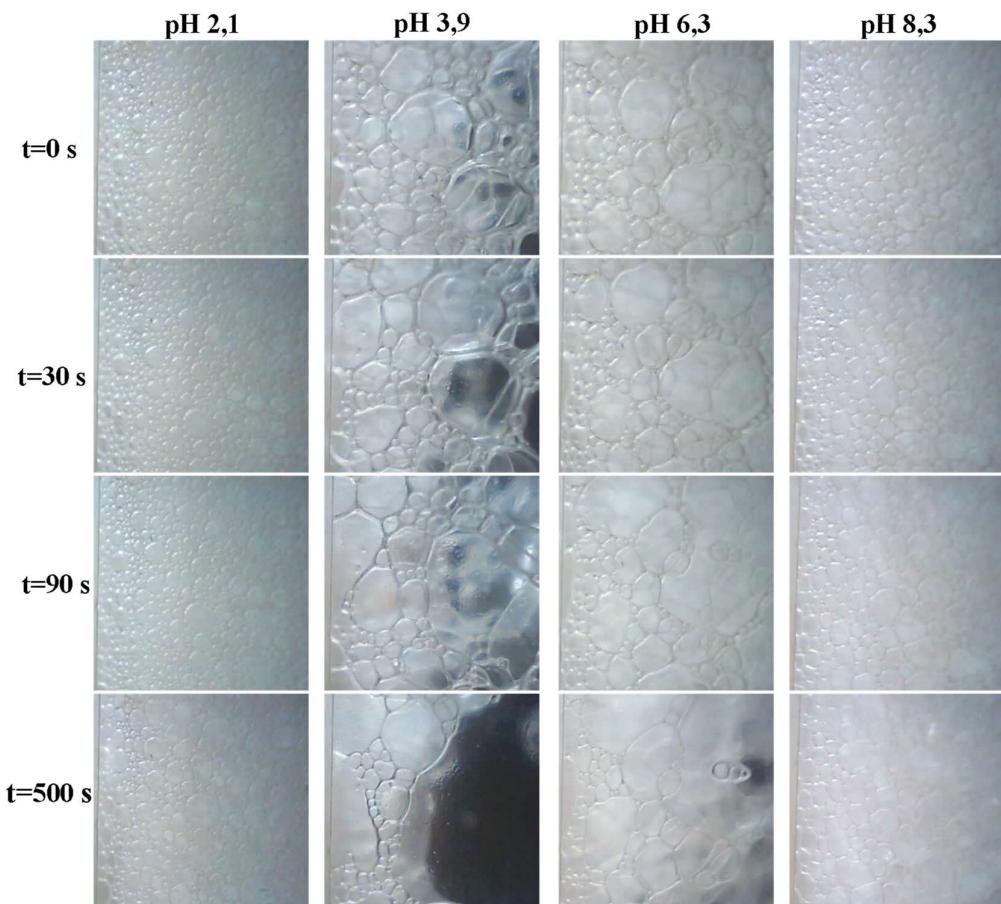


Figura VII.11: Fotografías tomadas al cese del burbujeo ($t= 0$ s) y a los 30 s, 90 s y 500 s de espumas preparadas al 0,1% p/p ($\mu= 0,10$).

Las fotografías de la evolución de las espumas preparadas al 0,5% p/p se presentan en la Figura VII.12. Como se mencionó anteriormente (Fig. VII.5), se obtuvieron burbujas de menor tamaño, pero con mayor grado de polidispersidad a pH 2,1 y 8,3. A pH 3,9, se observa la generación de mayor número de burbujas con respecto a 0,1% p/p, sin embargo esta espuma continua siendo la más inestable y a los 90 s fueron evidentes cambios en el

Capítulo VII

tamaño de las burbujas; a los 500 s el líquido incorporado drenó en gran parte y las burbujas poliédricas que se observan son restos de espuma adheridas a la pared del tubo. Las espumas permanecieron más estructuradas a pH 6,3 en el tiempo analizado, sin cambios aparentes en la forma de las burbujas. Esto permite explicar que a este pH el valor de V_8 haya sido mayor (Fig. VII.10b).

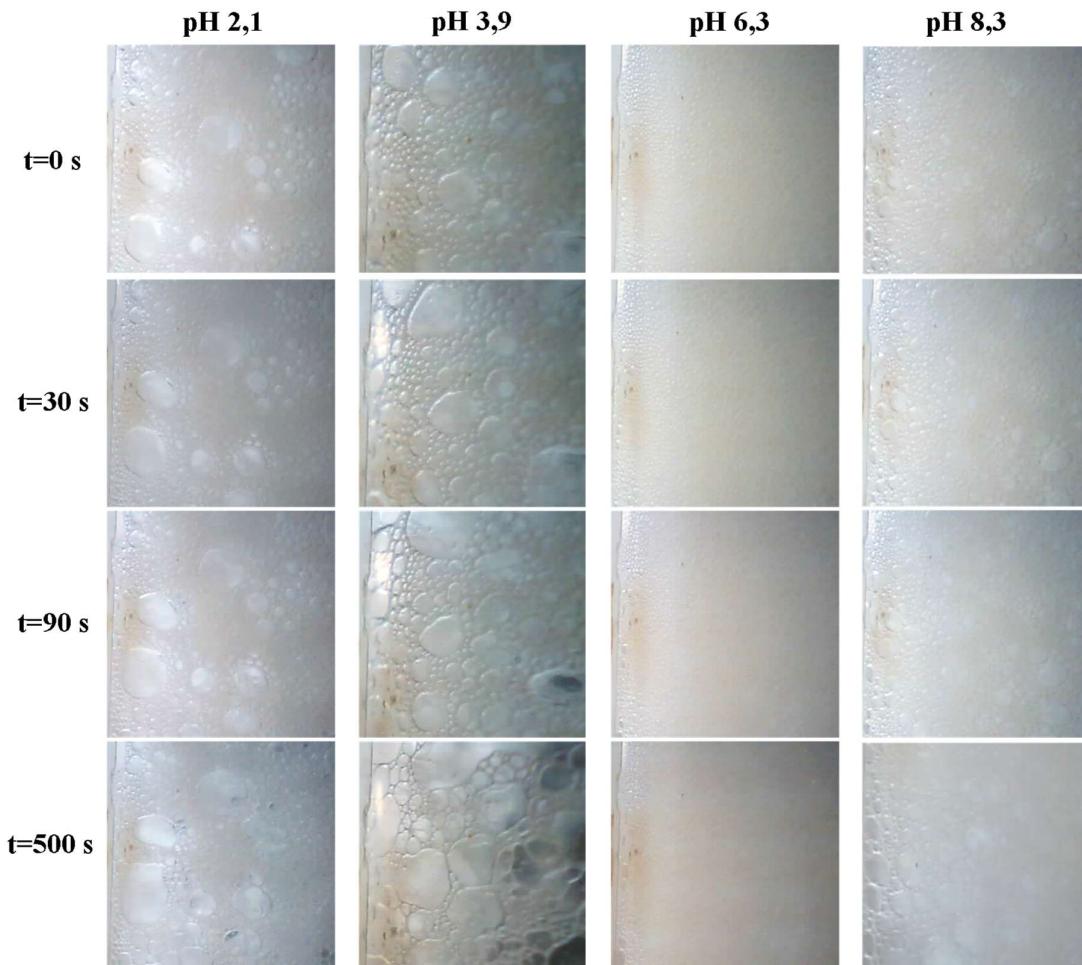


Figura VII.12: Fotografías tomadas al cese del burbujeo ($t=0$ s) y a los 30 s, 90 s y 500 s de espumas preparadas al 0,5% p/p ($\mu=0,10$).

Si bien el tiempo analizado es muy corto, con estos resultados se puede inferir que las espumas obtenidas a pH 3,9 son las más inestables, incluso al 0,5% p/p, a pesar del incremento observado en los parámetros $t_{1/2}$ y V_8 . Al 0,5% p/p, las espumas más estables fueron obtenidas a pH 6,3 y 8,3, que a su vez no presentaron diferencias significativas en los valores de V_{LE} y $t_{1/2}$.

Distintos autores informaron comportamientos diversos para la estabilidad de espumas obtenidas a partir de distintas fuentes proteicas. Ge y col. (2021) informaron que las espumas preparadas con aislado proteico de *Cicer arietinum*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Vigna radiata*, *Vigna unguiculata* y *Vigna angularis* fueron más estables a pH 3,0 y más inestables a pH 5,0 en un rango de 2 horas. En cambio, Khalid y Elhardallou (2015) encontraron que las espumas de aislado proteico de caupí a pH 9,0 eran las más estables en el rango de pH 2,0-12,0. Mwasaru y col. (2000) no encontraron cambios en la estabilidad de la espuma con la variación del pH para aislados proteicos de CC, la diferencia de comportamiento encontrada con Mwasaru y col. (2000) podría estar relacionada a la mayor desnaturización de las proteínas de CC por el método de obtención de los aislados proteicos.

Alta fuerza iónica

En la Figura VII.13a y 13b se muestran los valores de $t_{1/2}$ y $V_{8'}$, respectivamente, cuando $\mu = 0,54$. El aumento de la fuerza iónica tuvo un efecto negativo sobre la estabilidad de la espuma formada, excepto a pH 3,9 (0,1% p/p).

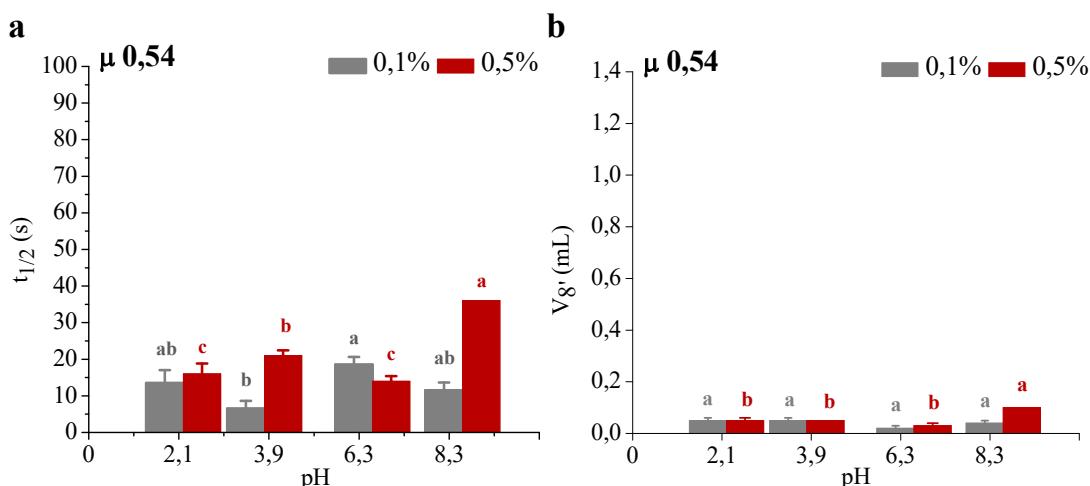


Figura VII.13: a) Tiempo medio de la espuma ($t_{1/2}$), y b) Volumen de líquido remanente en la espuma a los 8 minutos del cese del burbujeo ($V_{8'}$) en función del pH del medio al 0,1 y 0,5% p/p de proteína ($\mu = 0,54$). Letras distintas para cada concentración de proteína indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Al 0,1% p/p, únicamente las espumas preparadas a pH 3,9 y pH 6,3 mostraron diferencias significativas en el $t_{1/2}$ ($p < 0,05$). Con el aumento de la concentración de proteínas, los valores de $t_{1/2}$ aumentaron a pH 3,9 y 8,3 (siendo mayor a pH 8,3), a

Capítulo VII

diferencia de lo encontrado a baja fuerza iónica. La fuerza iónica del medio disminuye la repulsión electrostática entre las capas de proteínas adyacentes a la interfase de las burbujas vecinas y permite un rápido estrechamiento y ruptura de la lamela (Völp y col., 2021). Como consecuencia, las espumas drenan la mitad del volumen del líquido incorporado en menor tiempo.

Al 0,1% p/p, no hubo diferencias significativas ($p \geq 0,05$).en los valores de V_{8^*} en el rango de pH analizado (Fig. VII.13b). Con el aumento de la concentración de proteínas, V_{8^*} aumentó únicamente a pH 8,3. En el lapso de 8 min, las espumas preparadas en un medio de alta fuerza iónica drenaron casi en su totalidad el líquido incorporado.

En las Figuras VII.14 y VII.15 se encuentran las fotografías de las espumas al 0,1 y 0,5% p/p y su evolución en el tiempo, respectivamente. Como se mencionó anteriormente, el aumento de fuerza iónica provocó cambios en la forma y distribución de tamaño de las burbujas (Fig. VII.9). Al 0,1% p/p (Fig. VII.14), se destacó el mayor tamaño de las burbujas, lo cual está relacionado a una desestabilización más rápida de las espumas a pH 2,1 ($t = 500$ s) (Fig. VII.10 y Fig. VII.13), mientras que a pH 3,9 se verificó una mejora en la estabilidad hasta los 90 s, en comparación a lo encontrado a baja fuerza iónica. Así mismo, a pH 8,3, la espuma se mantuvo más estructurada, aunque no se vio reflejado en los parámetros $t_{1/2}$ y V_{8^*} (Fig. VII.13).

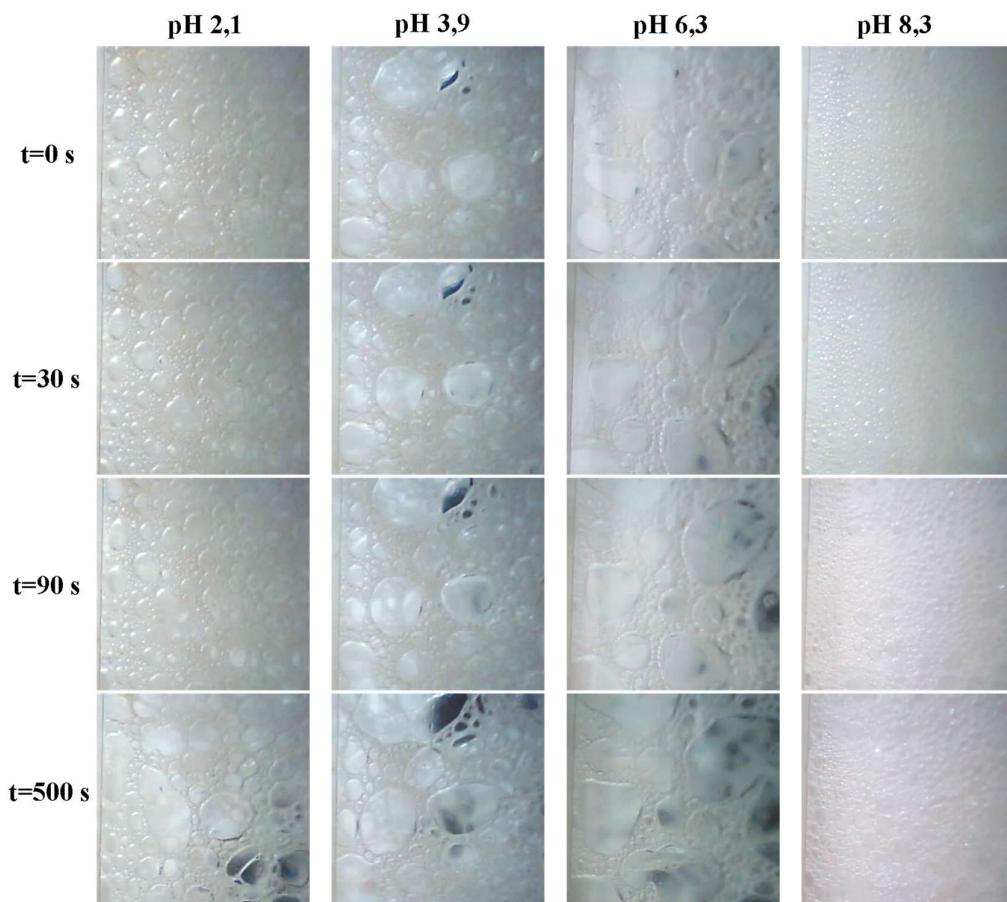


Figura VII.14: Fotografías tomadas al cese del burbujeo ($t= 0$ s) y a los 30 s, 90 s y 500 s de espumas preparadas al 0,1% p/p ($\mu= 0,54$).

Al 0,5% p/p (Fig. VII.15), las espumas preparadas a las distintas condiciones de pH no presentan grandes diferencias en cuanto a la forma y tamaño de las burbujas que las forman; además, se mantienen sin cambios apreciables hasta los 500 s, a diferencia de lo encontrado al 0,1% p/p. Al aumentar la concentración de proteínas, mejora el aspecto de la espuma (burbujas de menor tamaño y más homogéneas) y su estabilidad a pH 3,9, lo cual está reflejado en el valor de $t_{1/2}$. Por el contrario, si bien la espuma preparada a pH 8,3 mejora su estabilidad ($> t_{1/2}$ y $>V_8$), esto no se refleja en su aspecto (mayor tamaño de burbujas). El incremento de la concentración de proteínas a pH 2,1 y pH 6,3 provocó cambios en el aspecto de las espumas, aunque los parámetros de estabilidad no mostraron modificaciones importantes.

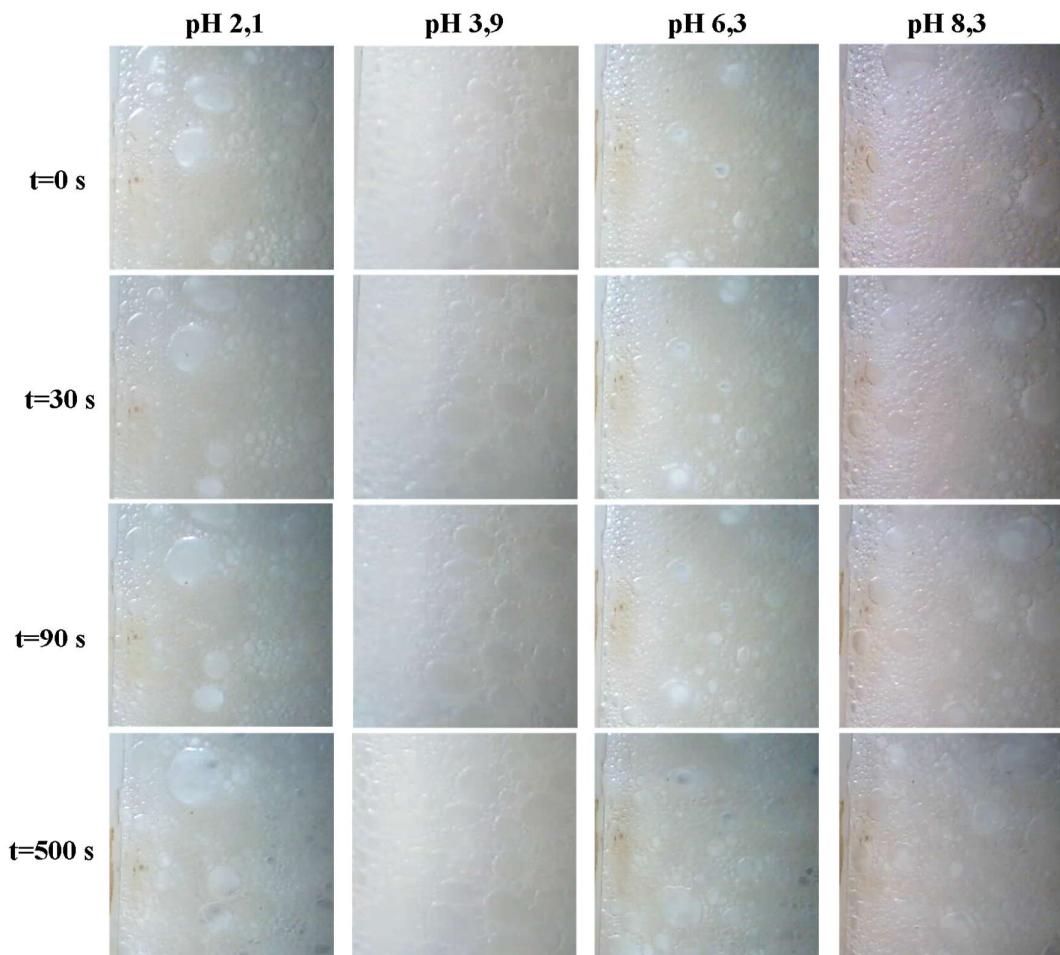


Figura VII.15: Fotografías tomadas al cese del burbujeo ($t= 0$ s) y a los 30 s, 90 s y 500 s de espumas preparadas al 0,5% p/p ($\mu= 0,54$).

La fuerza iónica influyó negativamente en la estabilidad de las espumas, excepto a pH 3,9 (0,1% p/p). En este sentido, Mwasaru y col. (2000) informaron una reducción significativa en la estabilidad de la espuma con el aumento de la fuerza iónica para aislados proteicos de CC. Resultados similares fueron encontrados para *Lupinus luteus* y *Lupinus angustifolius* (Piornos y col., 2015; Völp y col., 2021).

VII.2.1. Modelado de la desestabilización de la espuma

Los datos experimentales se ajustaron al modelo exponencial de primer orden (ver ítem III.4.3.2.2, Materiales y métodos) para facilitar la interpretación del proceso de desestabilización de las espumas. Este modelo permite explicar la desestabilización con dos procesos que ocurren en simultáneo, el drenado gravitacional y la difusión de gas entre burbujas de distinto tamaño (desproporción). El modelo permitió ajustar los parámetros V_g

y V_{dc} que corresponden al volumen de líquido que será eliminado por los procesos de drenado gravitacional y desproporción-colapso, respectivamente; y los parámetros cinéticos correspondientes a los tiempos de relajación para cada proceso (τ_g y τ_{dc}), donde un mayor tiempo de relajación implica una menor velocidad del proceso.

Baja fuerza iónica

En la Figura VII.16a y 16b se resumen los porcentajes de líquido drenado para cada proceso de desestabilización de las espumas al 0,1 y 0,5% p/p. Al 0,1% p/p, todas las espumas se desestabilizaron principalmente por drenado gravitacional, lo cual es característico de espumas inestables según lo informado por Bolontrade y col. (2016). Estos autores encontraron un comportamiento similar para espumas preparadas a partir de dispersiones de proteína de amaranto a pH 2,0 y 8,0, las cuales poseían valores de $t_{1/2}$ en el rango encontrado en esta tesis. Al 0,5% p/p el proceso de desestabilización de las espumas a pH 2,1 y 6,3 que predomina sigue siendo el drenado gravitacional, aunque se observó un incremento en la proporción de líquido drenado por desproporción y colapso. Este último fue el mecanismo principal de desestabilización a pH 3,9 (V_{dc} 70%) y 8,3 (V_{dc} 55%). A pH 3,9, el comportamiento observado podría estar relacionado a la presencia de proteína insoluble en los bordes de *Plateau* que retrasan el drenado del líquido, como se mencionó anteriormente (Fig. VII.10). Un comportamiento similar a pH 3,9 fue encontrado por Yu y Damodaran (1991), estos autores informaron que a pH cercano al pI se obtienen films interfaciales más viscosos y de mayor espesor debido a la ausencia de repulsión electrostática entre las moléculas de proteína. Sin embargo, llegado un nivel crítico en el espesor de la lamela, las moléculas de proteína comienzan a interaccionar entre si mediante fuerzas de *Van der Waals* e interacciones hidrofóbicas lo que produce agregación y la formación de huecos en la lamela que favorecen la desproporción y el colapso. A pH 8,3, el proceso predominante en la desestabilización es el de desproporción y colapso. Esto podría estar asociado a la mayor carga superficial de las proteínas a este pH (Fig. V.2), lo cual produciría un film interfacial más débil debido a una mayor repulsión electrostática, lo que favorecería la difusión del gas entre las burbujas. Por otro lado, las burbujas generadas a pH 8,3 son más heterogéneas ya que presentan diferencias de tamaño (Fig. VII.12). La presión dentro de una burbuja es mayor cuanto menor es su radio (ítem I.5.1.2, Ec. 4, Introducción) y considerando que la solubilidad de un gas es proporcional a su presión (Ley de Henry), esta será mayor en la vecindad de una burbuja pequeña. Esto causa el

Capítulo VII

transporte de gas por difusión desde las burbujas pequeñas hacia las grandes, aumentando el tamaño promedio de las mismas, proceso que se acelera a sí mismo (Carp, 2001).

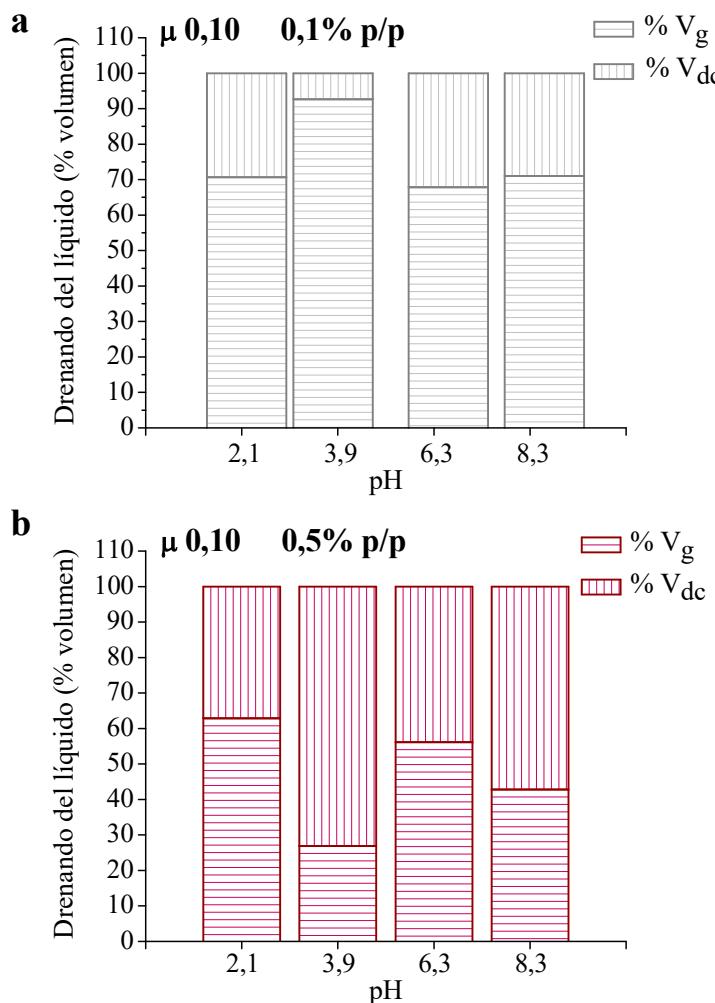


Figura VII.16: Porcentaje de líquido drenado en las espumas en función del pH por el proceso gravitacional (V_g) y por desproporción y colapso (V_{dc}) de **a)** espumas preparadas al 0,1 % p/p de proteína, y **b)** espumas preparadas al 0,5% p/p de proteína ($\mu = 0,10$).

Para analizar la velocidad a la que ocurren ambos procesos se hallaron los tiempos de relajación, los cuales se presentan en la Figura VII.17a y 17b. Un menor tiempo de relajación, implica una mayor velocidad de drenado de líquido. Al comparar ambos procesos, los valores de τ_g fueron un orden de magnitud menor que los valores de τ_{dc} para las espumas al 0,1% p/p. Esto está en relación con lo observado en la Figura VII.16a, donde la mayor proporción de líquido fue eliminado por drenado gravitacional. A pH 3,9 se encontraron los menores valores τ_g y de τ_{dc} , este último sin diferencias significativas con el valor hallado a pH 2,1 ($p \geq 0,05$). Esto nos permiten inferir que ambos procesos ocurren

con mayor rapidez con respecto al resto de los pH, lo que provoca que la espuma se desestabilice antes de terminar el burbujeo de gas.

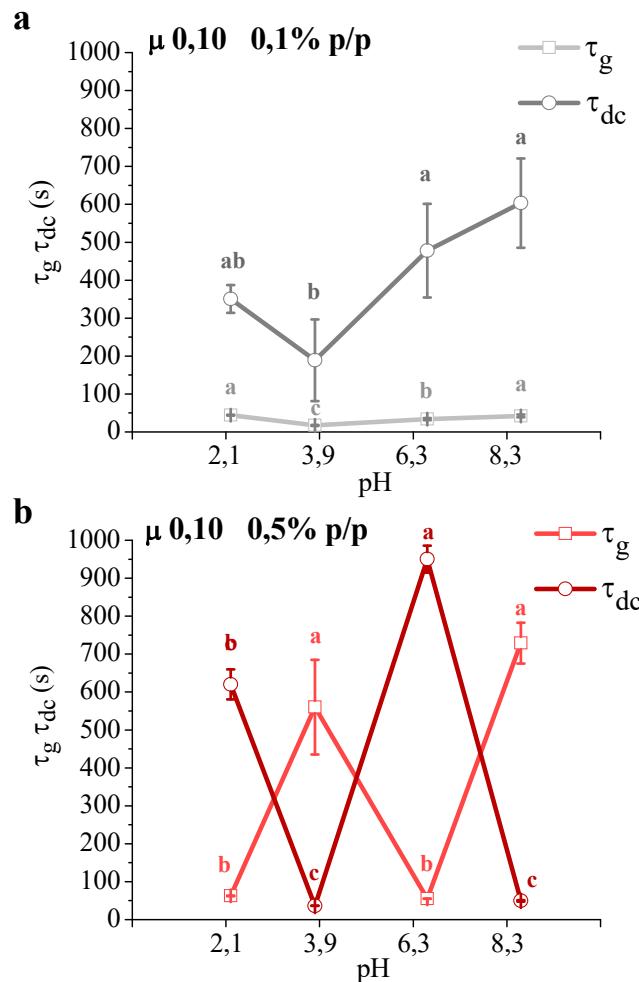


Figura VII.17: Tiempo de relajación del proceso de drenado gravitacional (τ_g) y tiempo de relajación del proceso de drenado por desproporción y colapso (τ_{dc}) en función del pH de espumas al a) 0,1% p/p de proteína, y b) 0,5% p/p de proteína ($\mu = 0,10$). Letras distintas para el mismo tiempo de relajación indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Al 0,5% p/p, τ_g aumentó considerablemente a pH 3,9 y 8,3, lo cual se relaciona con la menor proporción de líquido drenado por gravitación (Fig. VII.16b). El mayor valor de τ_{dc} se encontró a pH 6,3, esto implica una baja velocidad de drenado por difusión de gas lo cual está de acuerdo con la mayor cantidad de líquido remanente en la espuma a los 8 min ($V_{8'}$) (Fig. VII.10b). Por otro lado, a pH 8,3 la desestabilización por desproporción y colapso ocurre a mayor velocidad (menor τ_{dc}), sin embargo, se alcanza un volumen remanente de líquido en la espuma a los 8 minutos similar al encontrado a pH 6,3 con valores de $t_{1/2}$ también similares.

Capítulo VII

Alta fuerza iónica

Al aumentar la fuerza iónica, se obtuvieron espumas más inestables que a baja fuerza iónica, y dependiendo del pH y la concentración de proteína tuvo mayor importancia la contribución de uno u otro mecanismo de desestabilización. En la Figura VII.18a y 18b se resumen los porcentajes de líquido drenado para cada proceso de desestabilización de las espumas al 0,1 y 0,5% p/p a alta fuerza iónica.

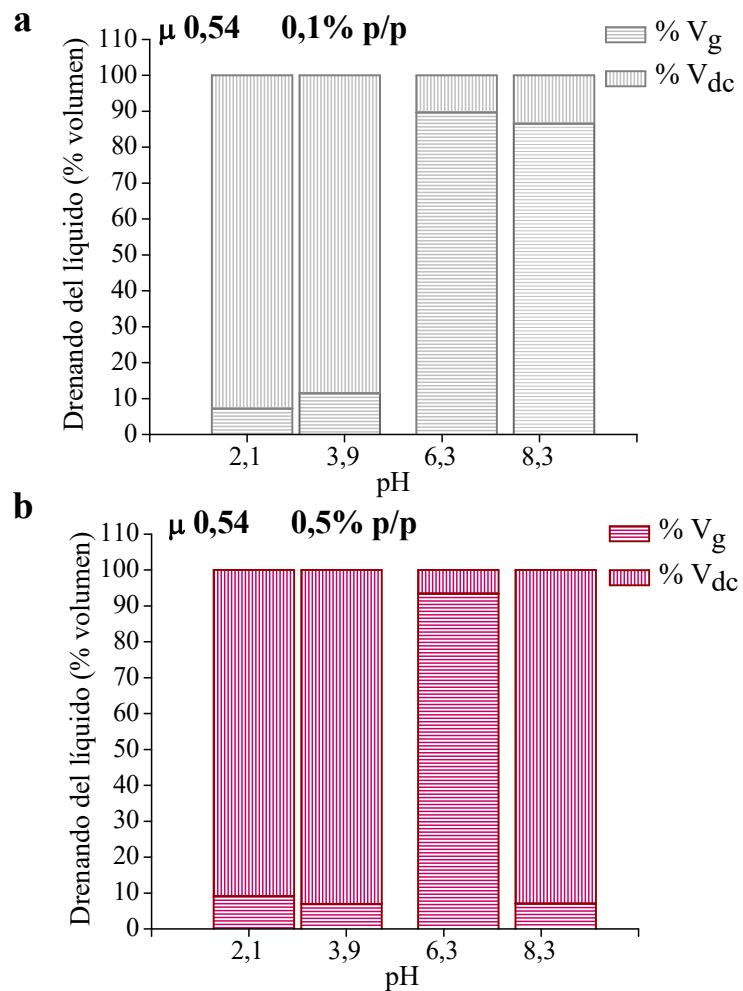


Figura VII.18: Porcentaje de líquido drenado en las espumas por el proceso gravitacional (V_g) y por desproporción y colapso (V_{dc}) en función del pH de a) espumas preparadas al 0,1 % p/p de proteína, y b) espumas preparadas al 0,5% p/p de proteína ($\mu = 0,54$).

Al 0,1% p/p, a pH por debajo del pI, la mayor pérdida de líquido ocurre por desproporción y colapso a diferencia de lo que ocurre a baja fuerza iónica; en cambio, las espumas preparadas a pH por encima del pI se desestabilizan principalmente por drenado gravitacional. Al aumentar la concentración de proteína, el mecanismo de desestabilización

se mantuvo a pH 2,1, 3,9 y 6,3 mientras que cambió a una desestabilización por desproporción y colapso a pH 8,3

Los tiempos de relajación de las espumas preparadas se detallan en la Figura VII.19a y 19b. Al analizar los tiempos de relajación de cada proceso, se observó que a alta fuerza iónica el valor de τ_g varió de forma particular para cada pH y concentración de proteína. Al 0,1% p/p, el valor de τ_g fue similar a pH 6,3 y 8,3, lo cual implica que en ambos casos la desestabilización por drenado gravitacional ocurre a igual velocidad, mientras que a pH 2,1 y 3,9 su valor fue mayor (Fig. VII.18a). Al 0,5% p/p, el principal cambio se observó a pH 8,3 donde la τ_g aumentó considerablemente cambiando el mecanismo de desestabilización predominante.

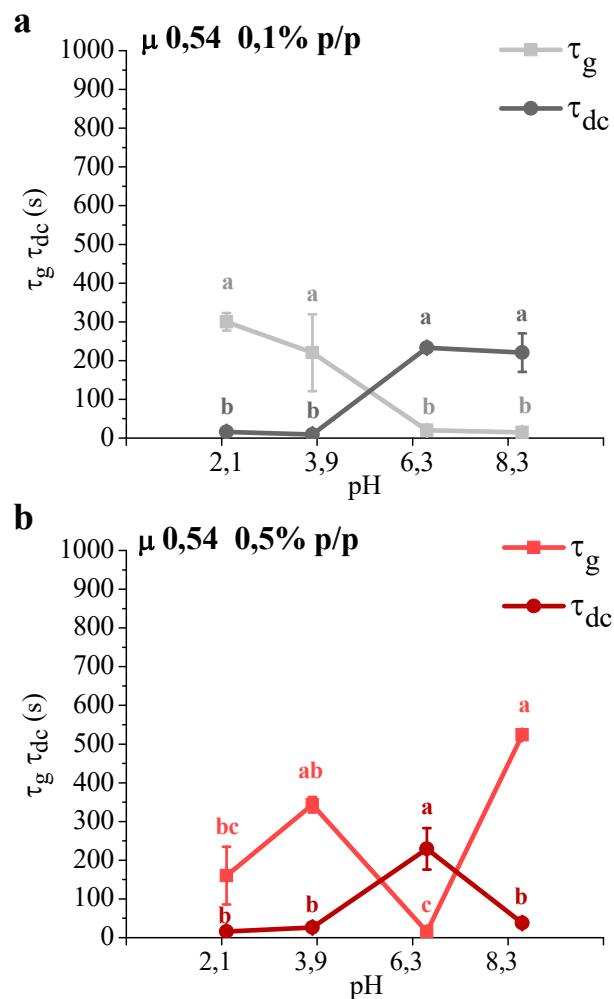


Figura VII.19: Tiempo de relajación del proceso de drenado gravitacional (τ_g) y tiempo de relajación del proceso de drenado por desproporción y colapso (τ_{dc}) en función del pH de espumas al **a**) 0,1% p/p de proteína, y **b**) 0,5% p/p de proteína ($\mu = 0,54$). Letras distintas para el mismo tiempo de relajación indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Capítulo VII

En cuanto a τ_{dc} (Fig. VII.19b), en la mayoría de las espumas disminuyó respecto a lo encontrado a baja fuerza iónica, por lo tanto, a alta fuerza iónica y a las dos concentraciones de proteínas ensayadas, el proceso ocurrió a una mayor velocidad. Este fenómeno puede estar relacionado a un adelgazamiento de la lamela como consecuencia de la menor repulsión electrostática entre las proteínas ubicadas en la interfase de las burbujas (por apantallamiento de las cargas debido a la presencia de las sales), permitiendo una mayor difusión del gas (Bolontrade y col, 2016).

VII.3. Conclusiones parciales

A baja fuerza iónica, al 0,1% p/p las dispersiones a pH 2,1 presentaron una mejor capacidad de formación de espuma mientras que a pH 3,9 la capacidad espumante fue muy baja. Cuando la concentración de proteína aumenta a 0,5% p/p, la capacidad espumante sería independiente del pH, a pesar de las diferencias encontradas en el tamaño y forma de las burbujas presentes en cada espuma. A esta concentración, las espumas obtenidas a pH 6,3 y pH 8,3 fueron las más estables, ya que presentaron valores de V_8' y $t_{1/2}$ muy cercanos entre sí pero mayores que al 0,1% p/p.

Al aumentar la fuerza iónica, la capacidad de formación de espuma de las proteínas de A8 empeoró en el rango de pH evaluado. En condiciones de alta fuerza iónica, el líquido incorporado en las espumas fue menor en comparación a las obtenidas a baja fuerza iónica, y las espumas fueron menos estables, las burbujas formadas colapsaron en menor tiempo.

En la mayoría de las espumas al 0,1% p/p, durante la etapa de desestabilización la mayor parte del líquido se eliminó por drenado gravitacional, el cual presentó un orden de magnitud mayor que el correspondiente al drenado por desproporción y colapso. El aumento en la concentración de proteína incrementó la proporción de líquido drenado por desproporción y colapso.

Capítulo VIII

Propiedades de interacción

proteína-proteína –

Gelificación

Para evaluar el proceso de gelificación de las dispersiones de A8 y su comportamiento reológico en las distintas condiciones de pH y fuerza iónica, se prepararon dispersiones al 8,0 y 10,0% p/p, teniendo en cuenta la concentración mínima de gelificación. Luego se obtuvieron geles a estas concentraciones de proteínas y se determinó su capacidad de retención de agua (WHC) junto con la reología de pequeña deformación. En base a los resultados obtenidos se decidió trabajar con geles al 10,0% p/p para evaluar la influencia del pH y fuerza iónica en las características de color, microestructura de la red proteica (MEB) y perfil de textura (TPA).

VIII.1. Mínima concentración de gelificación

La concentración de proteínas es uno de los factores más importantes que determinan las características finales de los geles. La mayoría de las proteínas exhiben una concentración mínima por debajo de la cual no gelifican (Pilosof, 2000b). La mínima concentración de gelificación (LGC) es ampliamente utilizada para evaluar la capacidad de gelificación de las proteínas, un valor bajo de LGC indica una mejor capacidad de gelificación (Adebiyi y Aluko, 2011). En la Tabla VIII.1 se resumen los resultados de LGC obtenidos para las dispersiones proteicas de A8 a distinto pH y fuerza iónica.

Tabla VIII.1: LGC de A8 a distinto pH y fuerza iónica

pH	Fuerza iónica (μ)	6% p/p	8% p/p	10% p/p	12% p/p	14% p/p
2,1	0,10	+	+	+	++	++
3,9		+	+	+	++	+++
6,3		+	+	++	+++	+++
8,3		+/-	+	++	+++	+++
2,1	0,54	+/-	+	+	+	+
3,9		+	+	+	++	++
6,3		-	+/-	+	+	+
8,3		-	+	++	++	++

(-) dispersión proteica líquida, (+/-) dispersión proteica viscosa, (+) gel débil, (++) gel autoportante, (+++) gel muy firme.

En general, no se encontraron diferencias entre los valores de LGC de las dispersiones preparadas a pH inferiores al pI y entre las dispersiones a pH mayores al pI de las proteínas de A8 (\approx pH 4,5). A baja fuerza iónica, la LGC se encontró entre 6,0-8,0% p/p mientras que a alta fuerza iónica varió entre 8,0-10,0%, resultando geles menos firmes

Capítulo VIII

con el aumento de la fuerza iónica. Esta diferencia puede deberse a que a alta fuerza iónica las proteínas de A8 presentaron una mayor estabilidad térmica por la presencia de sales (Fig. V.4 y Tabla V.1). La gelificación proteica es una propiedad que requiere la desnaturalización de las proteínas para favorecer la interacción entre las moléculas, donde a la temperatura del ensayo (95 °C), las proteínas podrían no estar lo suficientemente desnaturalizadas y por lo tanto se requiera una mayor concentración para la formación de la red proteica. Nuestros resultados fueron menores a los informados por Mwasaru y col. (2000), quienes evaluaron la LGC para aislados proteicos de CC en función del pH y la concentración de NaCl. Estos autores encontraron menor LGC a pH 4,0 en un rango de pH de 2,0-8,0 y una disminución de LGC desde 0,1 a 0,5 M de NaCl. Por otro lado, Akintayo y col. (1999) trabajaron con concentrados proteicos de CC e informaron que la habilidad de gelificación resultó menor a pH 8,0 con respecto a pH ácido, y al aumentar la fuerza iónica del medio el valor de LGC fue mayor. Ge y col. (2021) obtuvieron valores menores de LGC a pH 7,0 y 9,0 que a pH 3,0 para aislados proteicos de *Cicer arietinum*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Vigna radiata*, *Vigna unguiculata* y *Vigna angularis*, mientras que Piornos y col. (2015) encontraron un valor menor de LGC a pH ácido en comparación con el obtenido a pH alcalino para aislado proteico de *Lupinus luteus*.

VIII.2. Reología dinámica de pequeña deformación

Esta metodología permite el seguimiento del proceso de gelificación sin perturbar el sistema al aplicar pequeñas deformaciones que no afectan la estructura del material. En este ensayo se registró en función del tiempo la variación de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') y el ángulo de desfasaje ($\tan \delta$) (ver ítem III.4.3.3.2, de Materiales y métodos). En el estado fluido, G'' es mayor que G' . Luego de un cierto tiempo lag, G' y G'' comienzan a aumentar, siendo más rápido el incremento de G' y en un determinado tiempo, G' y G'' se cruzan, G' se hace mucho mayor que G'' . El punto de cruce se considera como el momento en el cual ocurre la gelificación (Punto de entrecruzamiento, PEC), es el punto donde ocurre la transformación de una estructura viscosa (sol) a una viscoelástica (gel) y las propiedades que caracterizan esta transición son fundamentalmente mecánicas (Pilosof, 2000b).

Baja fuerza iónica

El ciclo térmico ensayado contó con las siguientes etapas: calentamiento de 20 a 95 °C (10 °C/min), *plateau* a 95 °C durante 20 min, y una etapa de enfriamiento desde 95 a 20

°C (10 °C/min). En la Figura VIII.1 se muestran a modo de ejemplo las curvas de los módulos G' y G'' y de la temperatura en función del tiempo para dispersiones de A8 al 10,0% p/p. En la misma se observa una disminución de los valores iniciales de G' y G'' al principio del calentamiento, lo cual indicaría una desestructuración del sistema viscoelástico inicial a causa de la destrucción de interacciones proteína-proteína en las dispersiones (Felix y col., 2017; Peyrano y col., 2019).

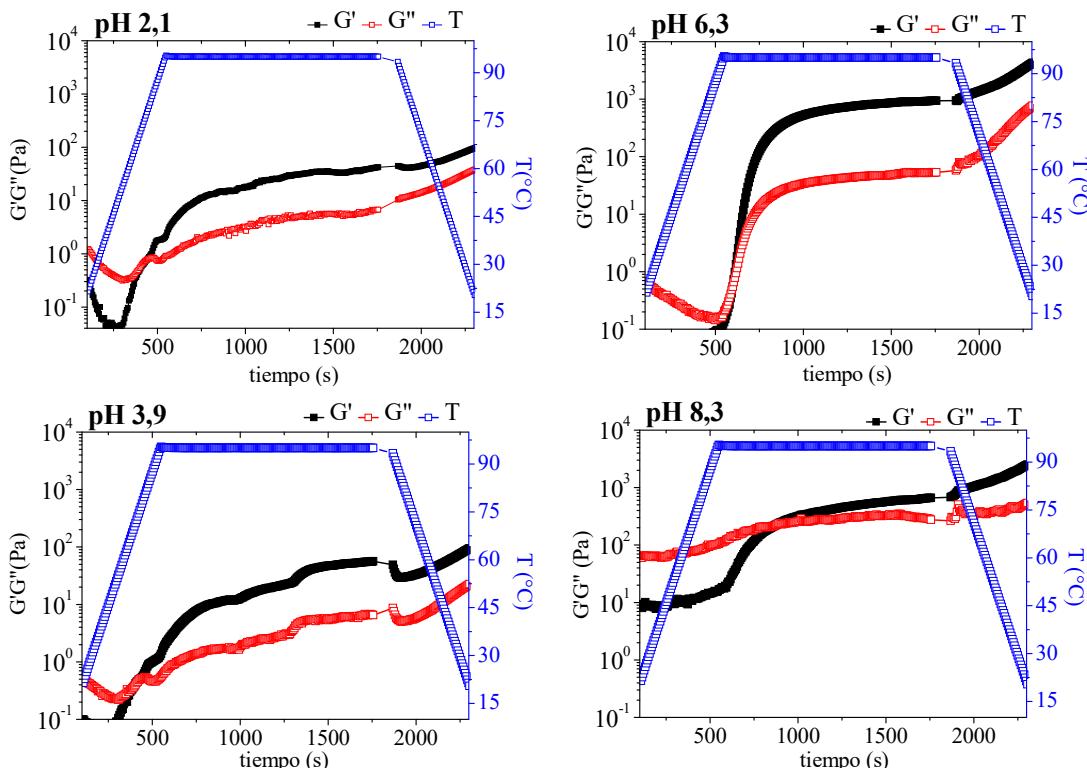


Figura VIII.1: Módulos G' y G'' y temperatura en función del tiempo para dispersiones de A8 al 10,0% p/p de proteína a distintos pH ($\mu = 0,10$).

Al analizar las curvas de los módulos G' y G'' en función del tiempo de las dispersiones de A8 al 10,0% p/p, a pH 2,1 el P_{EC} ocurrió durante la rampa de calentamiento mientras que a los demás pH el P_{EC} se encontró durante el *plateau*. Por otro lado, en las dispersiones preparadas al 8,0% p/p (Ver Anexo, Fig. A.1) se encontró que a pH 2,1 el P_{EC} no ocurrió en ningún momento del ciclo térmico, mientras que a pH 3,9 y 6,3 el P_{EC} se encontró durante la rampa de calentamiento (~75 °C). A pH 8,3, el P_{EC} ocurrió al final del *plateau*.

Para analizar las diferencias encontradas durante el proceso de gelificación, en la Figura VIII.2 se presentan los módulos G' y G'' en función del pH para las dispersiones al

Capítulo VIII

8,0 y 10,0% p/p al finalizar el *plateau* a 95 °C y al finalizar la etapa de enfriamiento a 20 °C.

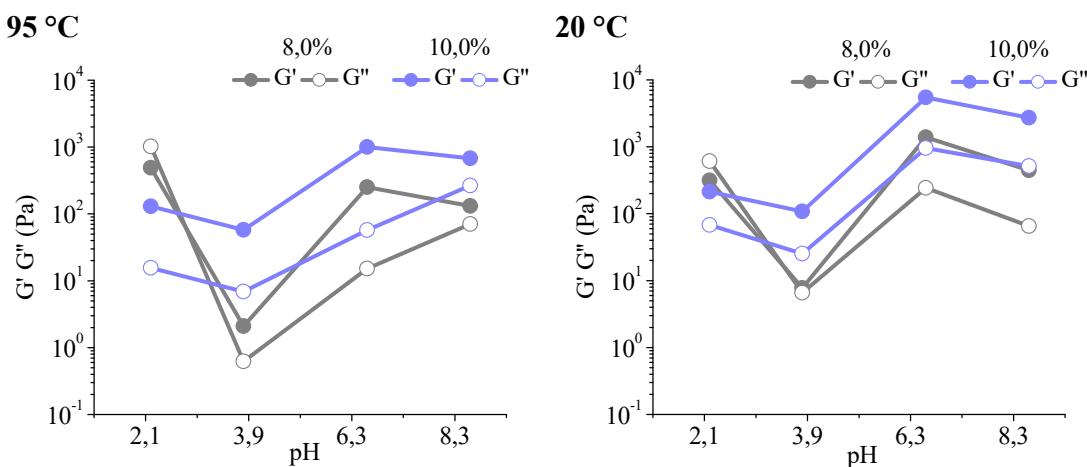


Figura VIII.2: Módulos G' y G'' (a 1 Hz) en función del pH para dispersiones de A8 al 8,0 y 10,0% p/p de proteína al finalizar el *plateau* a 95 °C y al finalizar la etapa de enfriamiento a 20 °C ($\mu = 0,10$).

En todos los casos se observó un comportamiento dependiente del pH y de la concentración de proteína de las dispersiones. Como se mencionó anteriormente, a pH 2,1 y 8,0% p/p no se alcanzó el PEC en ningún momento del ciclo, ya que $G'' > G'$ durante todo el ensayo. A pH 3,9, G' fue mayor a G'' tanto al final de *plateau* (95 °C) como luego del enfriamiento (20 °C). Dependiendo del comportamiento de las curvas de G' y G'' durante el ensayo, es posible inferir el tipo de interacciones que favorecen la formación de la red proteica. Teniendo en cuenta que la diferencia entre G' y G'' fue mínima a 20 °C a pH 3,9, la formación del gel se produciría principalmente por interacciones hidrofóbicas promovidas por una mayor exposición de estos residuos (Fig. V.3a), las cuales se favorecen durante el calentamiento y se debilitan con la disminución de la temperatura. A pH 6,3 se obtuvo la mayor diferencia entre G' y G'' (geles más elásticos) y a pH 8,3 las interacciones se reforzaron en frío, lo cual implica que prevalecen las interacciones electrostáticas o del tipo puente de hidrógeno. A diferencia de estos resultados, las dispersiones al 10,0% p/p presentaron la formación de gel a pH 2,1 ($G' > G''$) y un aumento considerable del módulo elástico a pH 6,3 y pH 8,3, principalmente luego del enfriamiento. El aumento en el componente elástico (G') con el incremento de la concentración de proteína fue informado por otros autores (Martin y col., 2014; Peyrano y col., 2019, Puppo y Añón, 1998; Zhang y col., 2010).

Una vez que ocurre el PEC, G' se vuelve mayor a G'' y la gelificación puede interpretarse en términos del componente elástico (Diedericks y col., 2019). En este sentido, a diferencia de nuestros resultados, Langton y col. (2020) y Tanger y col. (2022) informaron un valor máximo de G' a pH cercanos al π (pH 4,5-5,0) para geles de proteínas de *Vicia faba* y *Pisum sativum*, respectivamente.

El barrido de frecuencia, también llamado espectro mecánico de un gel, muestra la variación de G' y G'' en función de la frecuencia y permite definir un gel según un criterio reológico. Clark y Ross-Murphy (1987) describieron un espectro mecánico típico de un gel cuando se obtienen dos líneas prácticamente horizontales al graficar en escala logarítmica los módulos en función de la frecuencia, siendo G' de mayor magnitud a G'' en 1 o 2 órdenes logarítmicos. Los geles débiles muestran mayor dependencia con la frecuencia.

En la Figura VIII.3 se muestran los espectros mecánicos obtenidos para las dispersiones de A8 a distinto pH y concentración de proteína. Cuando la concentración de proteína fue 8,0% p/p, la dispersión a pH 2,1 se comportó como una solución diluida o entrelazada, donde G' fue menor a G'' en todo el rango de frecuencia analizado. A pH 3,9 se encontró un espectro característico de geles débiles, donde se observa una dependencia de los parámetros G' y G'' con la frecuencia. El comportamiento observado a pH 3,9 podría estar relacionado con sus valores de S_0 (Fig. V.5), la baja S_0 de estas proteínas promueve su agregación y posterior precipitación para disminuir el contacto de las regiones hidrofóbicas con el medio acuoso, por lo cual la presencia de agregados insolubles puede debilitar la estructura del gel (Britten y Giroux, 2001). A pH 6,3 se observa un espectro mecánico característico de un gel fuerte mientras que la dispersión a pH 8,3 presenta dependencia de la frecuencia de los módulos elástico y viscoso a 95 °C, pero éstos se vuelven independientes a 20 °C.

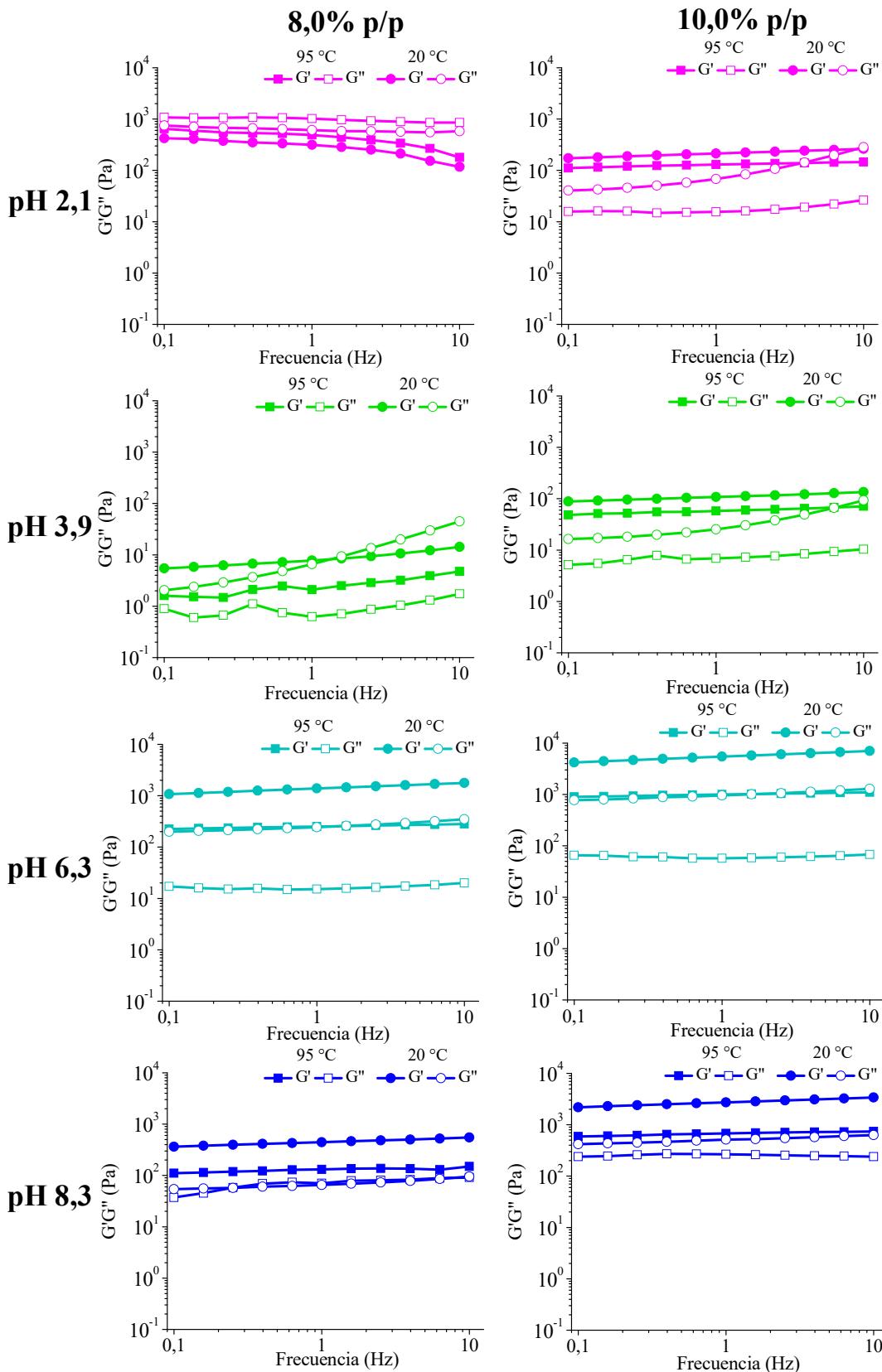


Figura VIII.3: Espectros mecánicos al final del *plateau* (95 °C) y al final del enfriamiento (20 °C) de dispersiones proteicas de A8 al 8,0 y 10,0 % p/p a distintos pH ($\mu = 0,10$).

Al 10,0% p/p de concentración de proteína, la dispersión a pH 2,1 a 95 °C presentó un espectro característico de un gel pero a 20 °C la dependencia de los módulos con la frecuencia fue mayor. A pH 3,9, si bien se observan ligeras diferencias en los espectros mecánicos respecto de 8,0% p/p, el espectro obtenido a 20 °C corresponde a un gel débil. A pH 6,3 no se encontraron diferencias con la concentración, mientras que a pH 8,3 la diferencia encontrada se observa a 95 °C en la independencia de los módulos elástico y viscoso con la frecuencia.

Zhang y col. (2007) describieron un comportamiento de solución diluida para dispersiones de proteína de garbanzo (15,0% p/v) a pH 3,0 ($G'' > G'$ en todo el ciclo térmico) mientras que para las dispersiones a pH 7,0 encontraron un comportamiento viscoelástico característico de un gel. Felix y col. (2017) evaluaron el espectro mecánico de geles de concentrados proteicos de arveja (12,0% p/p) y, si bien obtuvieron geles débiles tanto a pH 2,0 como a pH 6,5 y 8,0, esta característica fue más pronunciada a pH 2,0. Estos autores informaron que el desarrollo de uniones S-S a pH 6,5 y 8,0 estarían reforzando la red proteica. De forma similar, Errington y Foegeding (1998) encontraron que geles de proteínas de suero de leche entre pH 2,0-4,0 eran débiles y frágiles mientras que geles a pH neutro eran más fuertes y elásticos, posiblemente relacionado con la presencia de uniones S-S a pH 7,0. En este trabajo, encontramos que A8 tiene uniones disulfuro (Fig. IV.2) por lo cual las proteínas tendrían la posibilidad de interaccionar por medio de estas uniones a pH por encima del pI, contribuyendo positivamente a la formación de la red proteica del gel.

En la Tabla VIII.2 se resumen los valores de $\tan \delta (G''/G')$ a 1 Hz al finalizar el *plateau* y al finalizar el enfriamiento y los valores del parámetro Q (G'_{20}/G'_{95}). Un bajo valor de $\tan \delta$ indica un fuerte componente elástico de la matriz proteica, mientras que la relación G'_{20}/G'_{95} permite evaluar la formación de interacciones covalentes y no covalentes durante la etapa de enfriamiento (Andlinger y col., 2021). Un valor alto de Q se asocia a una alta proporción de interacciones electrostáticas y de puente de hidrógeno, mientras que un valor bajo se asocia con un gran número de puentes S-S e interacciones hidrofóbicas. La fuerza de las interacciones hidrofóbicas decrece con la disminución de la temperatura, mientras que se refuerzan las interacciones electrostáticas y puente de hidrógeno (Tanger y col., 2022).

Capítulo VIII

Tabla VIII.2: Viscoelasticidad ($\tan \delta$) y Q (G''_{20}/G'_{95}) en función del pH de dispersiones de A8 al 8,0 y 10,0% p/p ($\mu=0,10$).

pH	Proteína (% p/p)	$\tan \delta_{95^\circ\text{C}}$	$\tan \delta_{20^\circ\text{C}}$	Q
2,1	8,0	$2,07 \pm 1,25\text{a}$	$1,94 \pm 0,34\text{a}$	$0,5 \pm 0,2\text{c}$
3,9		$0,25 \pm 0,07\text{b}$	$0,82 \pm 0,04\text{b}$	$3,3 \pm 0,1\text{b}$
6,3		$0,06 \pm 0,01\text{b}$	$0,06 \pm 0,07\text{c}$	$4,9 \pm 0,2\text{a}$
8,3		$0,71 \pm 0,25\text{b}$	$0,16 \pm 0,02\text{c}$	$3,7 \pm 0,5\text{b}$
2,1	10,0	$0,16 \pm 0,03\text{b}$	$0,41 \pm 0,06\text{a}$	$2,0 \pm 0,4\text{c}$
3,9		$0,31 \pm 0,26\text{b}$	$0,30 \pm 0,10\text{ab}$	$1,4 \pm 0,5\text{c}$
6,3		$0,05 \pm 0,00\text{b}$	$0,17 \pm 0,00\text{b}$	$5,0 \pm 0,3\text{a}$
8,3		$0,89 \pm 0,20\text{a}$	$0,18 \pm 0,01\text{b}$	$3,7 \pm 0,7\text{b}$

Promedio \pm desvío estándar. Letras distintas en la misma columna para cada concentración de proteína indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Al 8,0% p/p, a pH 2,1 no se formó gel por lo tanto $\tan \delta$ es mayor a 1. Los valores más bajos de $\tan \delta$ se encontraron a pH 6,3, lo cual se relaciona con la formación de una estructura más elástica (Fig. VIII.2). A pH 3,9, $\tan \delta$ aumentó luego del enfriamiento, hecho que indica que el componente viscoso (G'') aumentó relativamente más rápido que el componente elástico (G') en esta etapa; el efecto contrario se encontró a pH 8,3.

Al 10,0% p/p, las interacciones entre proteínas fueron suficientes para favorecer la formación de un gel a pH 2,1 ($\tan \delta<1$) con mayor componente elástico antes del enfriamiento. A pH 3,9, $\tan \delta$ disminuyó en la etapa de enfriamiento, mientras que a pH 6,3 y 8,3 los valores de $\tan \delta$ no se vieron afectados por el aumento de la concentración proteica.

Si bien en la mayoría de los geles obtenidos se observó un refuerzo en la red proteica luego del enfriamiento ($Q>1$), el mayor valor de Q se obtuvo a pH 6,3, independientemente de la concentración de proteínas, lo cual sugiere que a este pH las interacciones puente hidrógeno y electrostáticas tienen un rol preponderante en la formación del gel.

Alta fuerza iónica

En la Figura VIII.4 se presentan los ciclos térmicos para las dispersiones de A8 al 10,0% p/p cuando $\mu=0,54$. Al igual que lo encontrado a baja fuerza iónica, al inicio del ciclo térmico, los módulos G' y G'' disminuyen como resultado de la desestructuración que

sufren los sistemas previo al comienzo de nuevas interacciones. De acuerdo con el comportamiento obtenido en LGC (Tabla VIII.1) y al efecto estabilizante de las sales encontrado (Tabla V.1) se esperaría que la formación de geles no esté favorecida por el mayor contenido de sales. Sin embargo, al analizar las variaciones de G' y G'' en función del tiempo, se observó un efecto positivo en ambas componentes a pH 2,1, 3,9 y 8,3, independientemente de la concentración de proteína ensayada. En cuanto a los geles a pH 6,3, se encontró un efecto negativo al 8,0% p/p con el aumento de la fuerza iónica (Ver Anexo, Fig. A.2).

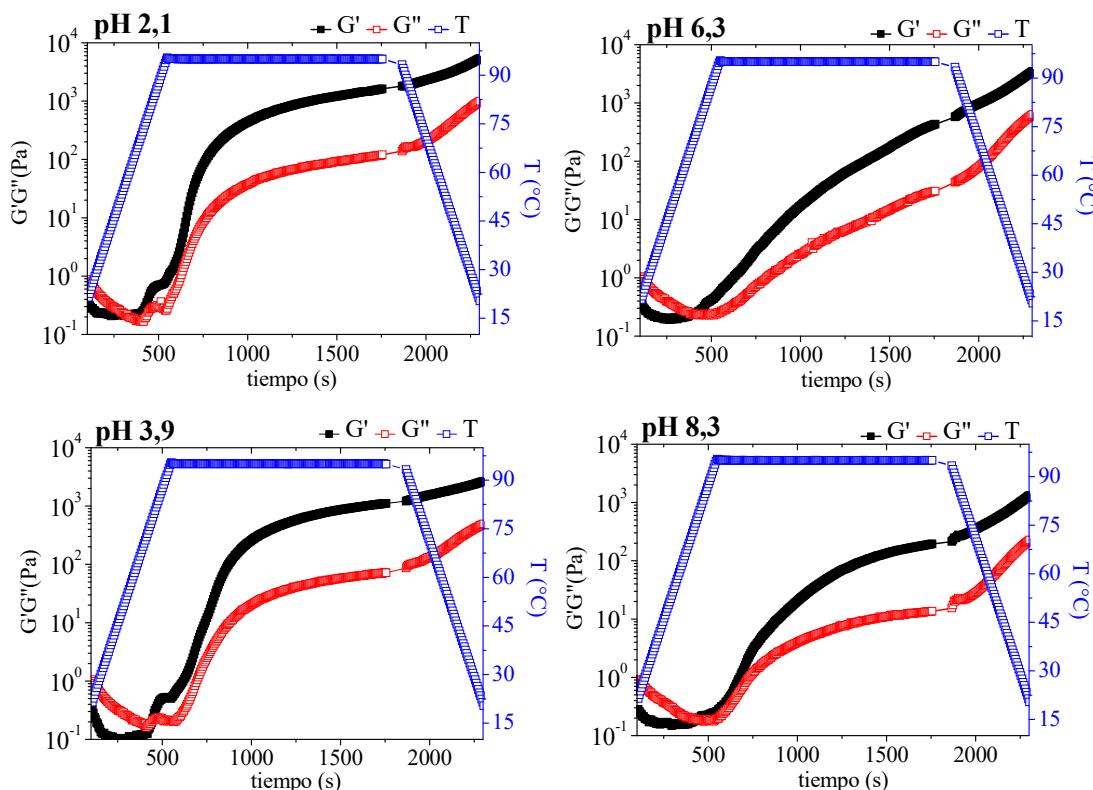


Figura VIII.4: Módulos G' y G'' y temperatura en función del tiempo de dispersiones de A8 al 10,0 % p/p a distinto pH ($\mu = 0,54$).

En la Figura VIII.5 se resumen los valores de G' y G'' al finalizar el *plateau* (95 °C) y el enfriamiento (20 °C). La componente elástica se vio favorecida por la fuerza iónica del medio a pH 2,1 y 3,9, aumentando considerablemente luego del enfriamiento. Esto puede ser el resultado de interacciones más fuertes o bien de la formación de un mayor número de enlaces que permiten a los geles soportar mayor deformación. En cuanto a la componente viscosa, ésta se vio afectada en menor medida con efectos diferentes a pH 2,1 y 3,9. A diferencia de lo que ocurre a baja fuerza iónica, a pH 6,3 no se alcanzó el P_{EC} al 8,0% p/p a

Capítulo VIII

95 °C, pero luego de la rampa de enfriamiento se obtuvieron geles con mayor componente elástica. A pH 8,3 y a 8,0% p/p las componentes (G' y G'') no se vieron afectadas al finalizar el ciclo térmico, sin embargo al 10,0% p/p ambos parámetros disminuyeron respecto de lo encontrado a baja fuerza iónica. La componente elástica de los geles a pH 2,1 y 3,9 fue mayor que la de los geles a pH 6,3 y 8,3. Un comportamiento similar fue encontrado para geles proteicos de soja (Renkema y col., 2000) y de arveja (Sun y Arntfield, 2011) en presencia de NaCl (0,2-0,3 M, respectivamente), informándose valores mayores de G' en geles a pH 3,0-4,0 que a pH 7,5-8,0.

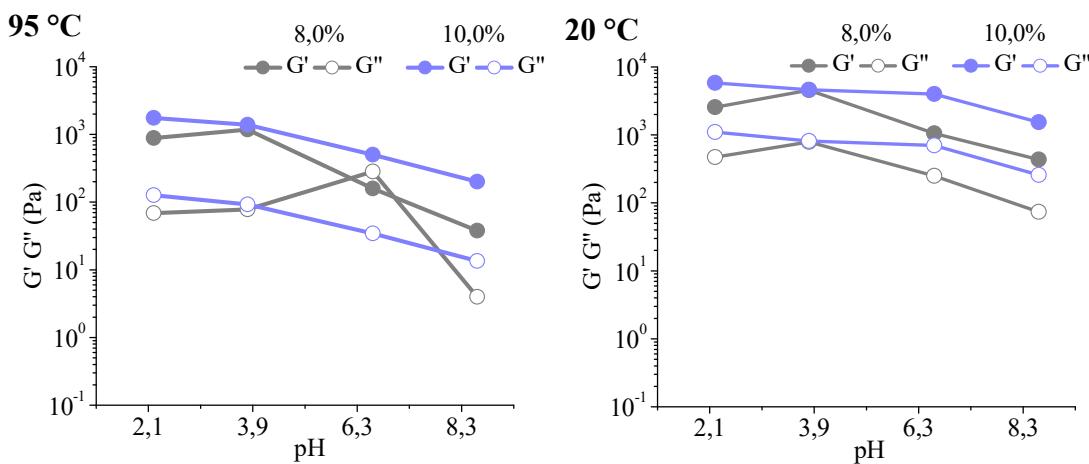


Figura VIII.5: Módulos G' y G'' (a 1 Hz) en función del pH de dispersiones de A8 al 8,0 y 10,0% p/p al finalizar el *plateau* a 95 °C y al finalizar la etapa de enfriamiento a 20 °C ($\mu = 0,54$).

En general A8 presentó un incremento de la componente elástica al finalizar el *plateau* a 95°C, salvo a pH 8,3 a las dos concentraciones proteicas ensayadas. A 20°C se observa que la componente elástica se refuerza o se mantiene inclusive a pH 8,3 independientemente de la concentración proteica. Así mismo, dependiendo de la matriz proteica utilizada se observan distintos comportamientos reológicos con la variación de la fuerza iónica. En este sentido, Tanger y col. (2022) informaron un aumento del componente elástico de geles proteicos de arveja a pH 3,0 y una disminución en geles a pH 7,0 al incrementar la fuerza iónica. En cambio, Langton y col. (2020) encontraron una disminución en la componente elástica de geles proteicos de *Vicia faba* a pH 5,0 y 7,0 en presencia de 2,0% p/v NaCl (0,34 M). Sun y Arntfield (2012) informaron un aumento en la componente elástica en presencia de 0,3 M de NaCl para geles proteicos de arveja a pH 5,7.

Los espectros mecánicos de los geles de A8 a alta fuerza iónica se encuentran en la Figura VIII.6. Al 8,0% p/p, a pH 2,1 y 3,9 los espectros mecánicos presentaron características compatibles con geles fuertes, por lo cual la fuerza iónica favorecería las interacciones entre las proteínas para establecer la red proteica tanto en calor como en frío. En cambio, a pH 6,3 a diferencia de lo que ocurrió a baja fuerza iónica, no se obtuvo gel al final del *plateau* pero si luego del enfriamiento; esto significa que en estas condiciones no sólo predominarían las interacciones electrostáticas y del tipo puente de hidrógeno, sino también que las proteínas necesitarían mayor tiempo para la formación de la red proteica. A pH 8,3 se incrementó la diferencia entre G' y G'' al final del *plateau* en comparación con lo encontrado a baja fuerza iónica (Fig. VIII.3), por lo cual el apantallamiento de cargas en un medio de alta fuerza iónica favorecería que las proteínas se unan por interacciones hidrofóbicas. Al 10,0% p/p, si bien se encontraron diferencias en los valores de la componente elástica (Fig. VIII.5), todos los geles presentaron espectros mecánicos característicos de geles fuertes (Fig. VIII.6). Zhang y col. (2007) obtuvieron geles proteicos de garbanzo (15,0% p/v) a pH 3,0 al aumentar la concentración de NaCl del medio (0,5-1,0 M), mientras que a pH 7,0 el efecto fue negativo y al final del ciclo térmico obtuvieron una solución entrelazada.

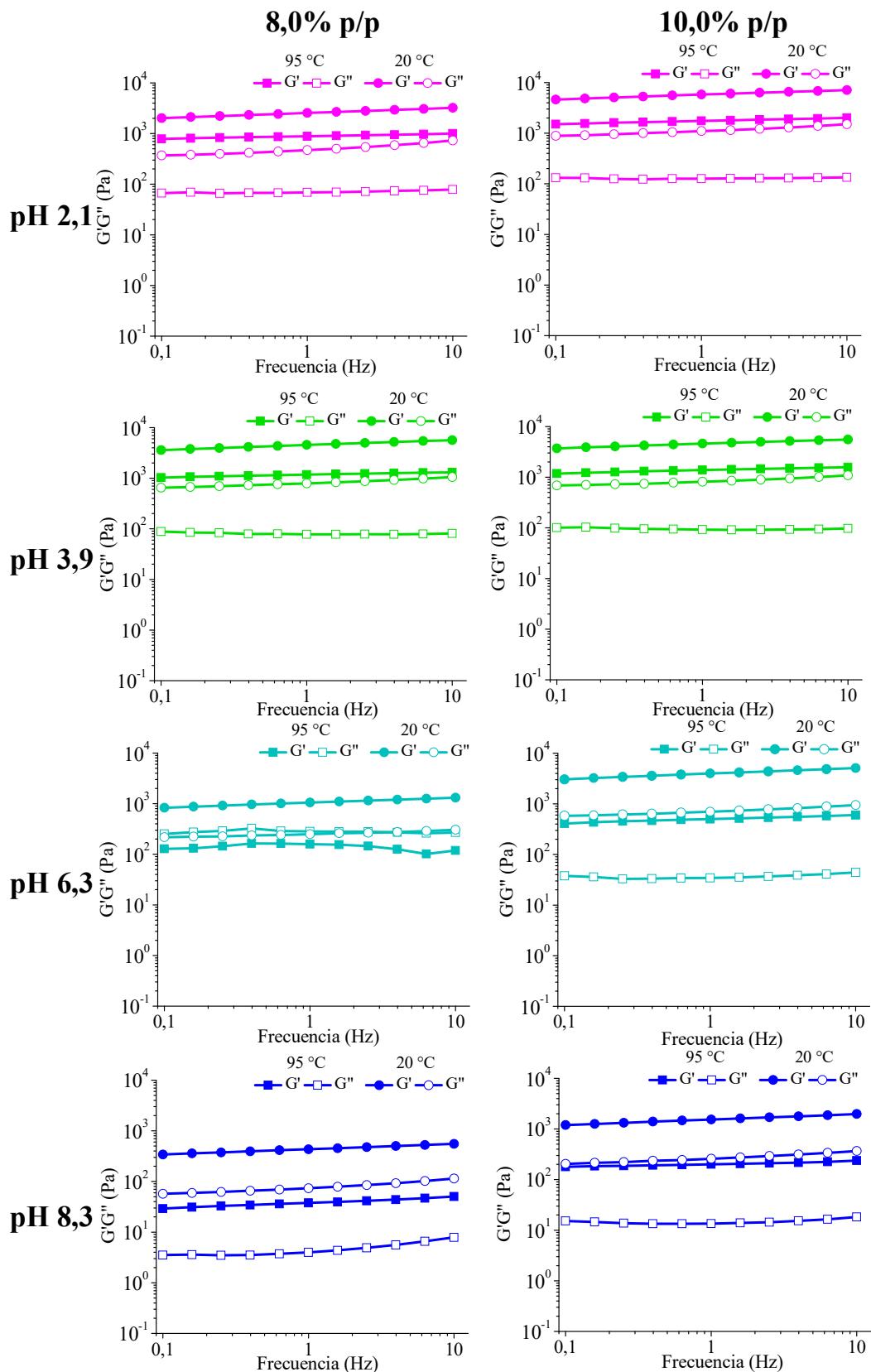


Figura VIII.6: Espectros mecánicos al final del *plateau* (95 °C) y al final del enfriamiento (20 °C) de dispersiones proteicas de A8 al 8,0 y 10,0 % p/p a distintos pH ($\mu = 0,54$).

Para analizar el tipo de interacción que estaría interviniendo en la formación de cada gel, se calcularon los valores de $\tan \delta$ y los valores de Q tanto al final de *plateau* (95 °C) como a 20 °C (Tabla VIII.3). Los valores de $\tan \delta$ sólo presentaron diferencia significativa a pH 6,3 al 8,0% p/p respecto de los demás pH ($p<0,05$), pero cuando la concentración de proteína fue 10% p/p, los valores de $\tan \delta$ fueron independientes del pH ($p\geq0,05$). En cuanto al valor de Q , en todos los casos hubo un incremento relativo de la componente elástica por el enfriamiento. Sin embargo, a pH 6,3 y 8,3 este incremento fue mayor, lo que estaría relacionado a un mayor número de interacciones que se favorecen en frío y por lo tanto estabilizan la estructura (interacciones electrostáticas y puente de hidrógeno).

Tabla VIII.3: Viscoelasticidad ($\tan \delta$) y Q (G'_{20}/G'_{95}) en función del pH de dispersiones de A8 al 8,0 y 10,0% p/p ($\mu= 0,54$).

pH	Proteína (% p/p)	$\tan \delta_{95^{\circ}C}$	$\tan \delta_{20^{\circ}C}$	Q
2,1	8,0	0,08 ± 0,00b	0,18 ± 0,00b	2,8 ± 0,2c
3,9		0,07 ± 0,00b	0,17 ± 0,00b	3,3 ± 0,6bc
6,3		1,78 ± 0,09a	0,24 ± 0,02a	6,2 ± 0,2b
8,3		0,10 ± 0,01b	0,17 ± 0,00b	11,6 ± 2,1a
2,1	10,0	0,07 ± 0,00a	0,18 ± 0,00a	3,0 ± 0,6b
3,9		0,07 ± 0,00a	0,18 ± 0,01a	3,0 ± 0,8b
6,3		0,07 ± 0,00a	0,18 ± 0,00a	8,5 ± 0,0a
8,3		0,07 ± 0,00a	0,17 ± 0,00a	7,2 ± 0,1a

Promedio ± desvío estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

VIII.3. Capacidad de retención de agua

Se determinó la capacidad de retención de agua (WHC) de los geles de A8 al 8,0 y 10,0% p/p. Luego del tratamiento térmico de las dispersiones (95 °C) y posterior almacenamiento a 4 °C durante 24 h, se logró obtener un gel autoportante a pH 2,1 al 8,0% p/p a diferencia de lo encontrado en el ensayo reológico de pequeña deformación. Esto puede deberse a que el mayor tiempo en frío favoreció la interacción entre las proteínas para la formación de la red proteica. WHC está relacionada al tipo de matriz formada en el gel. Los geles con una matriz ordenada y compacta presentan valores altos de WHC

Capítulo VIII

mientras que geles con una matriz gruesa y desordenada (más abierta) no pueden retener agua.

Baja fuerza iónica

En la Tabla VIII.4 se presentan los valores de WHC para los geles de A8 obtenidos en función del pH a baja fuerza iónica. Los valores más bajos de WHC se obtuvieron a pH 2,1 y 3,9, en las dos concentraciones proteicas ensayadas, y se incrementaron con el aumento de la concentración de proteína. En los geles a pH 3,9 (8,0% p/p) se observó sinéresis espontánea y los geles a pH 8,3 (8,0 y 10,0% p/p) presentaron la mayor retención de agua (>90%). La variación de WHC se debe a diferencias en la estructura de la red proteica formada a distinto pH. Estos resultados sugieren que los geles a pH 2,1 y 3,9 tendrían una estructura agregada o particulada, con poros más grandes, y por lo tanto con menor capacidad de retención de agua.

Tabla VIII.4: WHC de geles proteicos de A8 obtenidos al 8,0 y 10,0% p/p en función del pH ($\mu=0,10$).

pH	Proteína (% p/p)	WHC (%)	Proteína (% p/p)	WHC (%)
2,1		31,41 ± 1,61 dB		43,88 ± 0,92 cA
3,9	8,0	28,43 ± 0,10 cB	10,0	37,71 ± 0,11 dA
6,3		88,48 ± 0,68 bA		88,45 ± 0,85 bA
8,3		96,02 ± 0,53 aA		94,55 ± 0,49 aA

Promedio ± desvío estándar. Letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencia significativa ($p<0,05$). Letras mayúsculas distintas en la misma fila indican diferencia significativa ($p<0,05$). WHC: Capacidad de retención de agua (%)

El comportamiento encontrado debido a la variación del pH fue similar a lo informado por Zhao y col. (2018) para aislados proteicos de batata. Puppo (1997) informó valores más elevados de WHC para geles proteicos de soja a pH 2,75 (95%), a pH 3,50 (80%) y a pH 8,0 (95%).

Alta fuerza iónica

Cuando la fuerza iónica del medio fue 0,54, WHC mejoró entre un 35-55% a los pH por debajo del pI, mientras que a pH 8,3 disminuyó de manera significativa en un 3-5% ($p<0,05$). Los resultados a pH 2,1 y 3,9 concuerdan con el comportamiento reológico

descripto para estos geles (Fig. VIII.5 y VIII.6), ya que al aumentar la fuerza iónica se reforzaron las interacciones de la red proteica obteniéndose geles más elásticos.

El aumento de la concentración proteica mejoró WHC de los geles preparados a pH 2,1. Mientras que no se observaron diferencias significativas al aumentar la concentración de proteína al resto de los pH ensayados.

Tabla VIII.5: WHC de geles proteicos de A8 obtenidos al 8,0 y 10,0% p/p en función del pH ($\mu=0,54$).

pH	Proteína (% p/p)	WHC (%)	Proteína (% p/p)	WHC (%)
2,1		58,77 ± 3,73 dB		67,45 ± 2,51 bA
3,9		67,73 ± 2,88 cA		73,92 ± 1,42 bA
6,3	8,0	83,29 ± 2,53 bA	10,0	84,06 ± 2,98 aA
8,3		92,62 ± 0,69 aA		89,99 ± 2,82 aA

Promedio ± desvío estándar. Letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$). Letras mayúsculas distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p<0,05$). WHC: Capacidad de retención de agua (% agua retenida).

Puppo y Añón (1998) informaron una disminución del 50% de WHC en geles proteicos de soja a pH 2,75 y 3,5 en presencia de NaCl 0,5 M en comparación con los geles sin NaCl.

VIII.4. Color

En la industria de alimentos, el color es una característica que influye especialmente en la aceptación por parte del consumidor ya que su apreciación siempre se realiza en primer término (Calvo y Duran, 2002). Visualmente, todos los geles de A8 obtenidos al 10,0 % p/p presentaron distintas tonalidades de marrón (Fig. VIII.7 y VIII.9).

Baja fuerza iónica

Los geles preparados a pH por debajo del pI de las proteínas de A8 resultaron más opacos y amarillos que los geles a pH por encima del pI (Fig. VIII.7). Estos últimos presentaron un color pardo, siendo los geles a pH 8,3 ligeramente translúcidos. El color marrón de los geles podría explicarse por el contenido de polifenoles presentes en el aislado A8 ($17,91 \pm 0,11$ mg ácido gálico equivalentes/g de A8). Peyrano y col. (2022) informaron valores similares en aislado proteico de caupí. La variación del pH podría

Capítulo VIII

influir en los cambios de color debido a reacciones de oxidación en los polifenoles (Andlinger y col., 2021).

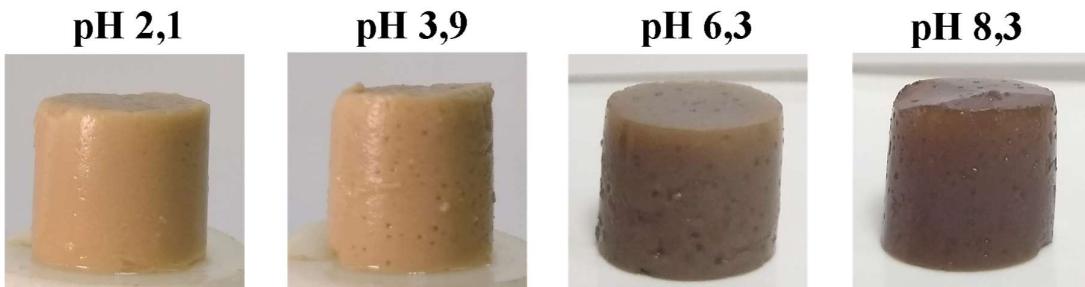


Figura VIII.7: Fotografías de geles de A8 al 10% p/p obtenidos a distinto pH ($\mu=0,10$).

Se ha relacionado la apariencia de los geles con el tipo de red formada (Bryant y McClements, 1998; Pilosof, 2000b; Renkema y col., 2000). Geles con apariencia opaca, como los obtenidos a pH por debajo del pI , se deben a una red más gruesa, de aspecto granular, con presencia de agregados densos, que dispersan la luz incidente, y que además presentan valores bajos de WHC (Tabla VIII.4). Resultados similares a los nuestros fueron informados para geles proteicos de soja a pH 3,8 y 7,6 (Renkema y col., 2000) y geles proteicos de *Vicia faba* a pH 5,0 y 7,0 (Langton y col., 2020).

Los parámetros de color CIELab de los geles se presentan en la Figura VIII.8. Los geles preparados a pH inferiores al pI resultaron más rojos y amarillos (mayor a^* y b^*), además de ser más claros (mayor L^*) que los geles a pH superiores al pI . El valor de H^* se refiere al tono y corresponde a los nombres que usamos para distinguir un color de otro, mientras que el valor de C^* es un indicador cuantitativo de la intensidad de un determinado tono. Los geles a pH 2,1 y 3,9 fueron más intensos (mayor C^*) que los geles a pH 6,3 y 8,3. Con respecto al valor de H^* , la principal diferencia se observa a pH 8,3 que resulta en geles menos amarillentos (menor H^*).

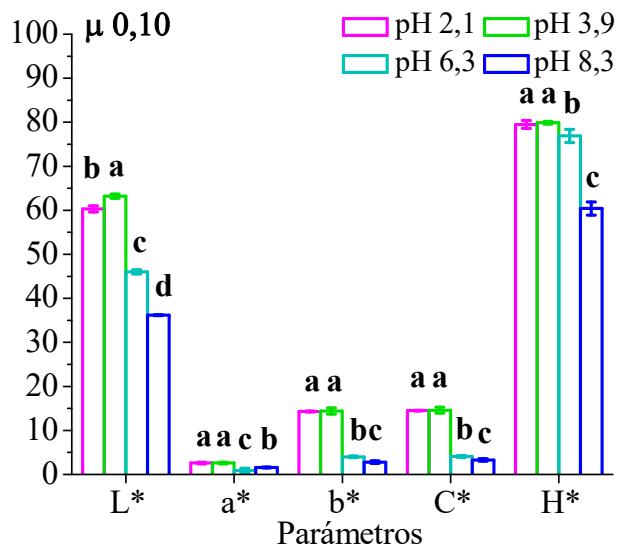


Figura VIII.8: Parámetros de color CIELab (a^* , b^* y L^*) de geles de A8 al 10,0% p/p de proteína en función del pH ($\mu = 0,10$). Letras minúsculas distintas en el mismo parámetro indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Alta fuerza iónica

Los geles obtenidos a distinto pH y alta fuerza iónica ($\mu = 0,54$) se presentan en la Figura VIII.9. La variación del pH en esta condición influye de manera más significativa que a baja fuerza iónica. Como consecuencia del aumento de la fuerza iónica, a simple vista puede apreciarse un tono marrón más claro y translúcido en los geles a pH 8,3.

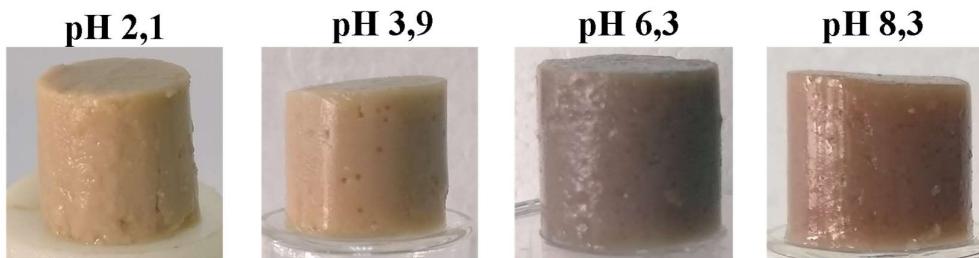


Figura VIII.9: Fotografías de geles de A8 al 10,0% p/p obtenidos a distinto pH ($\mu = 0,54$).

En cuanto a los parámetros CIELab (Fig. VIII.10), se mantuvieron las diferencias encontradas por el pH. Sin embargo, el aumento de fuerza iónica provocó una disminución en los parámetros a^* , b^* y C^* de los geles a pH 2,1 y 3,9, lo cual se relaciona con geles menos rojizos y amarillentos y menos intensos en su color. El efecto opuesto ocurrió a pH 6,3 y 8,3, ya que la mayoría de los parámetros aumentaron y los geles resultaron más claros e intensos en su color (mayor L^* y C^*).

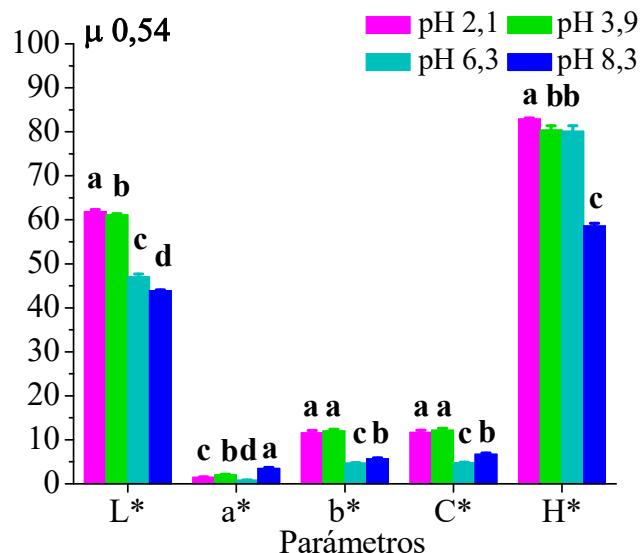


Figura VIII.10: Parámetros de color CIELab (a^* , b^* y L^*) de geles de A8 al 10,0% de proteína en función del pH ($\mu= 0,54$). Letras minúsculas distintas en el mismo parámetro indican diferencias significativas ($p<0,05$).

VIII.5. Microscopía electrónica de barrido

El método más común utilizado para la caracterización de la estructura de los geles proteicos es la microscopía electrónica de barrido (MEB), con la cual puede observarse directamente la microestructura de los geles y su superficie interna (Zhou y col., 2015). Mediante esta técnica se puede conocer la forma y grosor de los filamentos proteicos, el tamaño de poro de la matriz y distinguir los agregados y espacios ocupados por el solvente (Pilosof, 2000b). Las micrografías de los geles se presentan en las Figuras VIII.11 y VIII.12, en la mayoría de los casos hay diferencias en la red proteica en función del pH y la fuerza iónica.

Baja fuerza iónica

En la Figura VIII.11 se puede apreciar la diferencia entre la matriz de los geles obtenidos a pH por debajo del pI y los geles obtenidos a pH por encima del pI de A8 cuando la fuerza iónica del medio es baja. A pH 2,1 y 3,9 se observan estructuras agregadas y heterogéneas, además de la presencia de poros grandes. Los agregados observados a pH 3,9 son más grandes que los encontrados a pH 2,1. En cambio, los geles a pH 6,3 y 8,3 se caracterizan por presentar una matriz más compacta y homogénea, y se distingue la presencia de filamentos proteicos. Las diferencias encontradas en la microestructura de la matriz de los geles pueden atribuirse a una estructura inicial más

desnaturalizada en condiciones ácidas (Fig. V.4, Tabla V.1). Además, las características observadas de la matriz proteica en cada condición de pH concuerdan con los resultados encontrados para WHC (Tabla VIII.4) y color (Fig. VIII.7 y VIII.8).

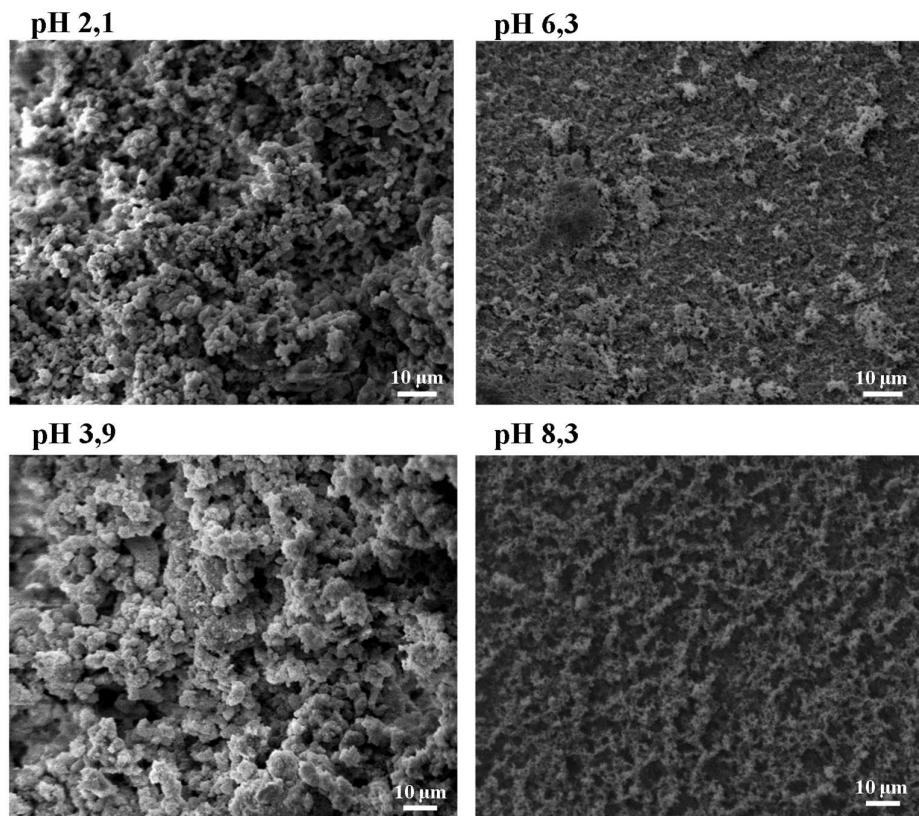


Figura VIII.11: Microscopía electrónica de barrido de geles de A8 al 10,0% p/p obtenidos a distinto pH ($\mu=0,10$). Aumento 2000x. Escala de la barra = 10 μm .

Nuestros resultados fueron similares a los informados para geles proteicos de soja a pH 3,8 y 7,6 (Renkema y col., 2000) y geles proteicos de *Vicia faba* a pH 5,0 y 7,0 (Langton y col., 2020). Estos autores describieron una estructura particulada y con grandes poros en los geles a pH 3,8 y 5,0, y una estructura de red más fina para los geles a pH 7,0 y 7,6. Zhao y col. (2018) observaron una red proteica desordenada a pH 3,0 para geles proteicos de papa, la cual mejoraba a pH 6,0 y a pH 9,0 volviéndose más compacta.

Alta fuerza iónica

Al aumentar la fuerza iónica, a pH 2,1 y 3,9 se observaron agregados más pequeños, así como poros de menor tamaño en comparación a los geles obtenidos a baja fuerza iónica, además de indicios de filamentos de proteínas (Fig. VIII.12). Estas características podrían indicar que se tratan de geles mixtos, lo cuales están constituidos

Capítulo VIII

por ambos tipos de estructura (filamentos de proteína y agregados). Estos resultados permiten explicar la mayor capacidad de retención de agua que presentaron estos geles (Tabla VIII.5).

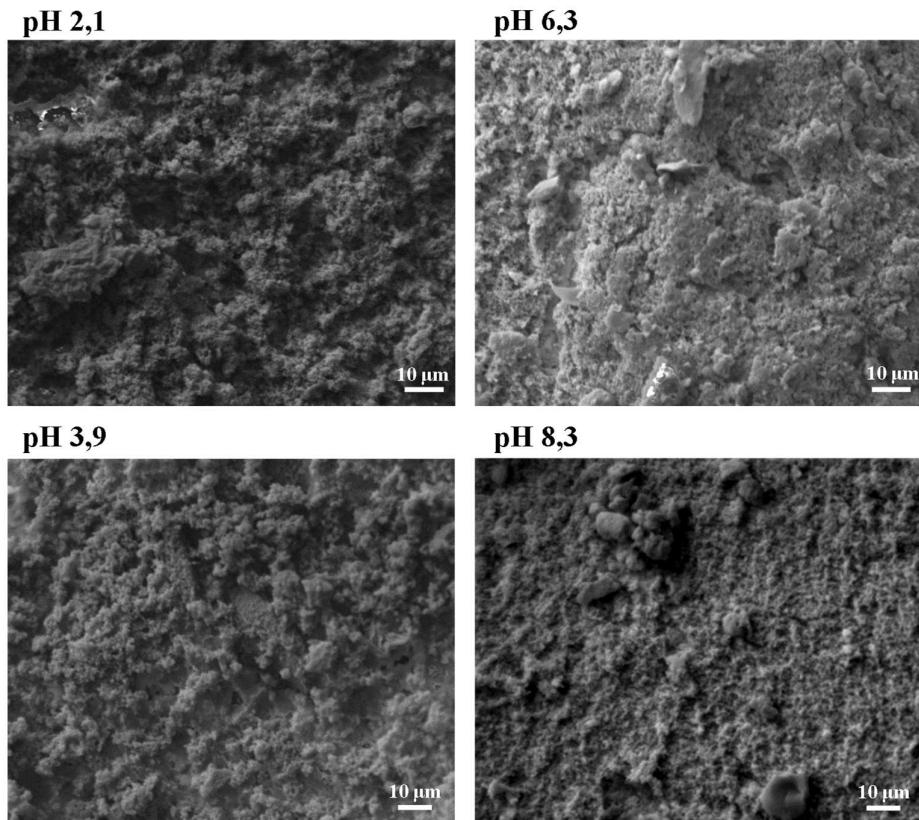


Figura VIII.12: Microscopía electrónica de barrido de geles de A8 al 10,0% p/p obtenidos a distinto pH ($\mu=0,54$). Aumento 2000x. Escala de la barra = 10 μm .

Las microestructuras a pH 6,3 y 8,3 fueron menos homogéneas que las observadas en la Figura VIII.11. Los filamentos de proteína se encuentran combinados con estructuras agregadas. Puppo (1997) informó en geles proteicos de soja a pH 8,0 una estructura menos homogénea de la matriz proteica con cantidades creciente de NaCl (0,1 y 0,25 M) y en geles a pH 2,75 encontró una estructura más abierta cuando $\mu > 0,5$. Esto último difiere de nuestros resultados a pH 2,1.

VIII.6. Perfil de textura de geles proteicos

El análisis del perfil de textura (TPA) consiste en registrar la respuesta de una muestra a dos compresiones sucesivas, imitando el proceso de masticación (Bourne, 1968). A partir de este ensayo se determinaron los parámetros de dureza, elasticidad, cohesividad y adhesividad de los geles de A8.

Baja fuerza iónica

Los valores de los parámetros analizados se resumen en la Figura VIII.13. A pH 6,3 se obtuvieron geles con mayor dureza y resistencia a la deformación que podría relacionarse con el valor de la componente elástica encontrada a este pH (Fig. VIII.2). La cohesividad y la elasticidad no variaron significativamente con el pH ($p \geq 0,05$) mientras que los geles preparados a pH 2,1 se diferenciaron del resto por una mayor adhesividad.

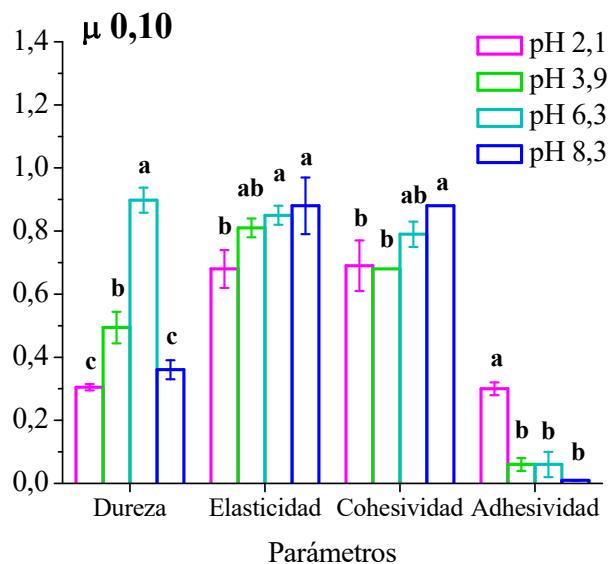


Figura VIII.13: TPA de geles de A8 al 10,0% p/p ($\mu = 0,10$). Promedio \pm desvío estándar.

Letras distintas en el mismo parámetro indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Nuestros resultados se encuentran en el rango informado para geles proteicos de *Vigna unguiculata* (Peyrano y col., 2021). Shand y col. (2007) estudiaron la dureza y cohesividad de geles proteicos de arveja en función del pH (6,0-8,5) y encontraron que los geles a pH 7,1-7,2 presentaron la mayor dureza mientras que describieron una relación lineal positiva entre el pH y la cohesividad de los geles.

Puppo (1997) encontró que geles proteicos de soja eran más duros a pH 8,0 que a pH ácidos probablemente porque a pH alcalino se ven favorecidas las interacciones proteína-proteína por uniones S-S, las cuales contribuyen a reforzar la red proteica. La presencia de uniones S-S en la red proteica de geles a pH 8,3 no se ve reflejada en la dureza de estos geles. Posteriores ensayos de solubilidad diferencial son necesarios para poder discriminar los tipo de interacciones involucrados en la formación de los geles de A8.

Capítulo VIII

Alta fuerza iónica

Las diferencias encontradas por la variación del pH se vieron modificadas con el aumento de la fuerza iónica. La dureza de los geles a pH 2,1, 3,9 y 8,3 aumentó (~40-60%) mientras que disminuyó a pH 6,3 (~30%), los geles con mayor dureza fueron los obtenidos a pH 3,9. Cuando $\mu= 0,54$, la So a pH 3,9 aumenta un ~50% (Fig. V.5), esto lleva a suponer que la red proteica está formada tanto por proteína soluble como por agregados insolubles que se incorporan de manera activa a la red, contribuyendo a la dureza de los geles (Tanger y col., 2022). La elasticidad continuó siendo similar a todos los pH ($p\geq 0,05$), a pesar del aumento observado a pH 2,1. La cohesividad disminuyó en los geles a pH 6,3 y 8,3, sin embargo los geles más cohesivos fueron los de pH 8,3. Los geles a pH 2,1 y 3,9 presentaron mayor adhesividad.

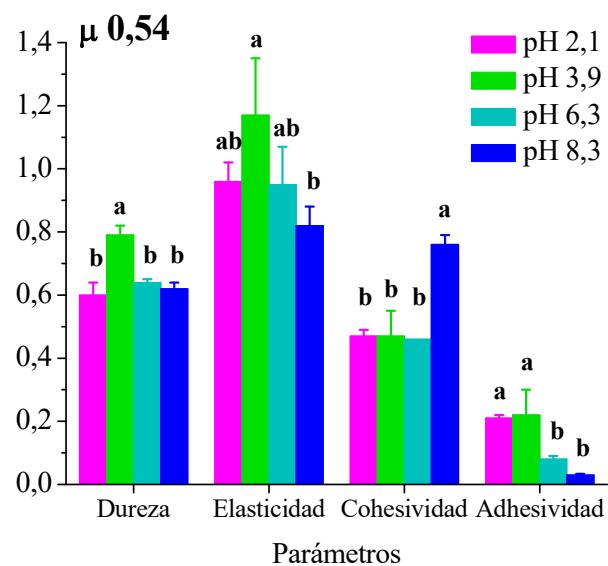


Figura VIII.14: TPA de geles de A8 al 10,0% p/p ($\mu= 0,54$). Promedio \pm desvío estándar.

Letras distintas en el mismo parámetro indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Puppo (1997) informó un aumento en la dureza y adhesividad de geles de aislado proteico de soja obtenidos a pH 3,5 al aumentar la concentración de NaCl (0,5 M). Por otro lado, Shand y col. (2007) no encontraron cambios en la dureza y la cohesividad de los geles de arveja al variar la concentración de NaCl de 0 a 2,0% p/v (0,34M).

VIII.7. Conclusiones parciales

El pH y la fuerza iónica son dos variables importantes que influyen en la formación de geles de A8 de CC y en sus características finales de capacidad de retención de agua, color y TPA.

A baja fuerza iónica, la capacidad de gelificación de las proteínas de A8 es menor a pH 2,1 y 3,9, obteniéndose geles débiles. Sin embargo, modificando el pH a 6,3 y 8,3 esta capacidad aumenta y se logran obtener geles más elásticos, con mejores propiedades para retener agua. En los geles a pH 6,3 y 8,3 predominarían las interacciones puente de hidrógeno en la formación de los geles, y las uniones S-S podrían contribuir a reforzar la matriz. Los geles a pH por debajo del pI tienen un estructura agregada y más abierta que los geles a pH por encima del pI. Esto permite explicar las diferencias encontradas en WHC y en el aspecto de los geles.

En general, la formación de geles se vio favorecida al aumentar la fuerza iónica del medio, principalmente a pH 2,1 y 3,9. Esto puede ser el resultado de interacciones más fuertes o bien de la formación de un mayor número de interacciones entre los polipéptidos. Es importante señalar que a pH 3,9 se logró formar un gel con buenas propiedades de textura y capacidad de retención de agua aun cuando las proteínas involucradas en la formación de la red se encontraban agregadas. La microestructura de los geles se vio afectada por la fuerza iónica, a pH 2,1 y 3,9 disminuyó el tamaño de los agregados y de los poros; pH 6,3 y 8,3 el aspecto fue menos homogéneo en comparación a lo encontrado a baja fuerza iónica, pero esto no afectó WHC de estos geles en gran medida.

Si bien las propiedades viscoelásticas de los geles obtenidos determinarán su uso, se debe tener en cuenta que la variación del pH afecta el color, lo cual es una característica importante para la aceptación de un producto.

El impacto del pH fue más pronunciado que el efecto encontrado por la fuerza iónica en la gelificación de las proteínas de A8. La influencia de la fuerza iónica fue mayor en geles a pH por debajo del pI.

Conclusiones

Generales

Se obtuvieron las fracciones proteicas mayoritarias (ALB y GLB) de CC, donde el rendimiento de extracción para la fracción GLB fue bajo, sin embargo se logró una buena separación de ambas fracciones para su caracterización físico-química y estructural.

En general, la fracción GLB está formada por polipéptidos de mayor peso molecular y de mayor carácter acídico que los presentes en la fracción ALB. Además, los perfiles electroforéticos y cromatográficos revelaron la presencia de agregados proteicos en la fracción GLB. Los resultados obtenidos en DSC, fluorescencia intrínseca e hidrofobicidad superficial demostraron que la fracción GLB posee una estructura más compacta y menos flexible que la fracción ALB, lo que le confiere una mayor estabilidad frente a agentes desnaturalizantes como la urea.

Por el proceso de extracción alcalina y posterior precipitación isoeléctrica, los aislados proteicos de CC fueron enriquecidos en la fracción GLB como pudo comprobarse por sus características físico-químicas semejantes a esta fracción. En general, el aumento en el pH de extracción para la obtención de aislados proteicos de CC promovió la desnaturalización de las proteínas con la consecuente formación de agregados proteicos.

El estudio de las similitudes y diferencias de las propiedades físico-químicas entre las fracciones proteicas y los aislados proteicos permitió profundizar y enriquecer el conocimiento acerca de las proteínas de CC y que determinará sus propiedades tecnofuncionales.

La variación del pH y la fuerza iónica promovió cambios estructurales en el aislado A8. A baja fuerza iónica, las proteínas presentaron mayor grado de desnaturalización y una estructura más abierta a pH por debajo del pI. El perfil de So en función del pH tuvo la forma típica de U. Cuando la fuerza iónica del medio fue mayor, el rango de So fue más estrecho como consecuencia de la menor variación conformacional de las proteínas frente al cambio del pH. La mayor presencia de sales aumentó la estabilidad térmica de las proteínas. Las dispersiones de A8 disminuyeron la tensión interfacial de las interfases o/w y a/w con ligeras diferencias de acuerdo con el pH y fuerza iónica del medio, aún a pH cercano al pl.

Se obtuvieron emulsiones estables utilizando dispersiones de A8 como agente emulsionante y estabilizante de emulsiones o/w (20% p/p de aceite). Las características y estabilidad de las emulsiones fueron dependientes del pH, fuerza iónica y concentración de proteína utilizada. A baja fuerza iónica, las gotas más pequeñas se

Conclusiones Generales

obtuvieron en los pH extremos, relacionado con la elevada So y carga neta de las proteínas a estos pH. El aumento de fuerza iónica provocó un incremento en el tamaño de gota en todo el rango de pH. La concentración crítica de proteínas fue diferente de acuerdo con el pH y la fuerza iónica de la emulsión, y varió entre 1,5 y 2,0% p/p a baja fuerza iónica mientras que fue entre 1,0 y 1,5% p/p a alta fuerza iónica. Las emulsiones de A8 presentaron diferentes grados de floculación, donde las emulsiones a pH 6,3 ($\mu=0,10$) y pH 2,1 y 3,9 ($\mu=0,54$) se caracterizaron por el mayor IF. Estas emulsiones fueron las más viscosas y registraron una caída pronunciada en su viscosidad con el aumento de la velocidad de cizalla, relacionado a la ruptura o disociación de los flóculos. En general, las emulsiones fueron estables a la coalescencia en los siete días de almacenamiento (4°C). A baja fuerza iónica y cuando la concentración de proteínas fue $\geq 1,0\%$ p/p, las emulsiones a pH 2,1, 6,3 y 8,3 tuvieron un comportamiento similar. Fenómenos de coalescencia fueron evidentes a pH 3,9 a baja fuerza iónica, relacionados principalmente a la baja So de A8 en estas condiciones. Al aumentar la fuerza iónica, la estabilidad de la emulsión fue pH dependiente. El cambio más notable se obtuvo en las emulsiones a pH 3,9, donde la estabilidad fue mejorada incluso a bajas concentraciones de proteína. Si bien la mayoría de las emulsiones presentaron floculación, la presencia de flóculos resultó favorable en su estabilidad.

A8 resultó un buen agente emulsificante, aumentando la estabilidad de emulsiones o/w en condiciones alejadas del pI cuando la fuerza iónica del medio es baja. Estas proteínas podrían ser utilizadas como ingredientes en aderezos o bebidas de origen vegetal, contribuyendo a la estabilidad de estos sistemas.

Las propiedades espumantes de A8 fueron función del pH, fuerza iónica y concentración de proteína utilizada. A baja fuerza iónica, y a 0,1% p/p de proteína, la capacidad de formación de espuma de las dispersiones de A8 fue mejor a pH 2,1, mientras que a pH 3,9 los procesos de desestabilización ocurrieron a una mayor velocidad que la formación de la espuma en estas condiciones. El comportamiento a pH 3,9 se debe principalmente al bajo contenido de proteína soluble disponible para migrar a la interfase a/w. A mayor concentración de proteína (0,5% p/p), mejoró la capacidad espumante de A8 en todo el rango de pH analizado y su comportamiento fue independiente del pH. En cuanto a la estabilidad de las espumas formadas también fue afectada por las condiciones de ensayo. Las espumas fueron más estables a pH 2,1 (0,1% p/p) y a pH 6,3 y 8,3 (0,5% p/p), lo cual podría estar relacionado con características del film interfacial creado. El aumento de fuerza iónica del medio influyó

negativamente en la capacidad de formación de espuma de A8 y en la estabilidad de las mismas, excepto a pH 3,9 (0,1% p/p), donde la mayor cantidad de proteína disponible permitió la generación de burbujas más pequeñas y en mayor número. Las espumas incorporaron menor cantidad de líquido, el cual drenó rápidamente y casi en su totalidad en el tiempo analizado. El aumento de la concentración de proteínas, si bien mejoró los resultados obtenidos, la proporción fue menor en comparación a lo encontrado a baja fuerza iónica. Las mejores condiciones para utilizar las proteínas de A8 para la obtención de espumas serían a pH ácido (pH 2,1) y cercanos a la neutralidad (pH 6,3) en condiciones de baja fuerza iónica.

Estudios futuros basados en el comportamiento interfacial de las proteínas de CC en las interfas o/w y a/w son necesarios para el desarrollo de sistemas macroscópicamente estables.

La capacidad de formación de geles térmicos del aislado A8 fue similar al de otras especies vegetales. A baja fuerza iónica, la capacidad de gelificación de las proteínas de A8 fue menor a pH 2,1 y 3,9, obteniéndose geles débiles. Sin embargo, modificando el pH a 6,3 y 8,3 esta capacidad aumentó y se obtuvieron geles más elásticos, con mejores propiedades para retener agua (>80%). Las diferencias encontradas estarían en relación con las uniones que estabilizan la red proteica, a pH por debajo del pI predominarían las interacciones hidrofóbicas mientras que a pH por encima del pI tendrían mayor importancia las interacciones puente hidrógeno. Los geles a pH 2,1 y 3,9 presentaron una microestructura agregada y más abierta que los geles a pH 6,3 y 8,3, los cuales se caracterizaron por una estructura compacta y homogénea. Esto permite explicar las diferencias encontradas en WHC y en el aspecto de los geles. Al aumentar la fuerza iónica del medio, la formación de geles se vio favorecida principalmente a pH 2,1 y 3,9, a pesar de la mayor estabilidad térmica de A8 en todo el rango de pH ($T_d \approx 115-132^\circ\text{C}$). La microestructura de los geles reveló una disminución del tamaño de los agregados y de los poros a pH 2,1 y 3,9, lo cual explica el aumento en WHC. A pH 6,3 y 8,3 el aspecto fue menos homogéneo en comparación a lo encontrado a baja fuerza iónica, pero esto no afectó la WHC de estos geles en gran medida.

Si bien las propiedades viscoelásticas de los geles obtenidos determinarán su uso, se debe tener en cuenta que la variación del pH afecta el color de los geles, lo cual es una característica importante para la aceptación de un producto. El ajuste adecuado de pH y fuerza iónica es preciso para el uso efectivo de las proteínas de A8 de CC como ingrediente en la generación de textura de productos alimenticios.

Conclusiones Generales

Debido a sus propiedades nutricionales y funcionales, el aislado A8 de CC constituye una opción válida para ser utilizado como ingrediente en productos de la industria alimentaria o bien conducir al desarrollo de productos innovadores adecuados para aquellos consumidores que demandan fuentes de proteínas alternativas.

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen a revalorizar el cultivo y la producción de semillas de CC, lo cual impacta favorablemente en la agrobiodiversidad de la región.

Referencias Bibliográficas

- Abugoch, L. E., Martínez, N. E., & Añón, M. C. (2010). Influence of pH on structure and function of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates. *Cereal chemistry*, 87(5), 448-453.
- Abugoch, L. E., Romero, N., Tapia, C., Silva, J., & Rivera, M. J. (2008). Study of Some Physicochemical and Functional Properties of Quinoa (*Chenopodium Quinoa Willd*) Protein Isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4745–4750.
- Acevedo, B. A., Avanza, M. V., Chaves, M. G., & Ronda, F. (2013). Gelation, thermal and pasting properties of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.), dolichos bean (*Dolichos lablab* L.) and jack bean (*Canavalia ensiformis*) flours. *Journal of Food Engineering*, 119(1), 65–71.
- Acevedo, B. A., Thompson, C. M., González Foutel, N. S., Chaves, M. G., & Avanza, M. V. (2017). Effect of different treatments on the microstructure and functional and pasting properties of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.), dolichos bean (*Dolichos lablab* L.) and jack bean (*Canavalia ensiformis*) flours from the north-east Argentina. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(1), 222-230.
- Achouri, A., Nail, V., & Boye, J.I. (2012). Sesame protein isolate: Fractionation, secondary structure, and functional properties. *Food Research International*, 46(1): 360–369.
- Adebiyi, A. P., & Aluko, R. E. (2011). Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed protein isolate. *Food Chemistry*, 128(4), 902-908.
- Adenekan, M. K., Fadimu, G. J., Odunmbaku, L. A., & Oke, E. K. (2018). Effect of isolation techniques on the characteristics of pigeon pea (*Cajanus cajan*) protein isolates. *Food science & nutrition*, 6(1), 146-152.
- Akande, K. E., Abubakar, M. M., Adegbola, T. A., Bogoro, S. E., Doma, U. D. (2010). Chemical evaluation of the nutritive quality of pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. *International journal of poultry science*, 9(1), 63-65.
- Akintayo, E.T., Oshodi, A.A., & Esuoso, K.O. (1999). Effects of NaCl, ionic strength and pH on the foaming and gelation of pigeon pea (*Cajanus cajan*) protein concentrates. *Food Chemistry*, 66, 51–56.
- Al-Ali, H. A., Shah, U., Hackett, M. J., Gulzar, M., Karakyriakos, E., & Johnson, S. K. (2021). Technological strategies to improve gelation properties of legume proteins with the focus on lupin. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 102634.
- Alavi, F., Chen, L., Wang, Z., & Eman-Djomeh, Z. (2021). Consequences of heating under

Referencias Bibliográficas

- alkaline pH alone or in the presence of maltodextrin on solubility, emulsifying and foaming properties of faba bean protein. *Food Hydrocolloids*, 112, 106335.
- Alizadeh-Pasdar, N., & Li-Chan, E. C. (2000). Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 328-334.
- Alonso, D. O., Dill, K. A., & Stigter, D. (1991). The three states of globular proteins: acid denaturation. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 31(13), 1631-1649.
- Andlinger, D. J., Bornkeßel, A. C., Jung, I., Schroeter, B., Smirnova, I., & Kulozik, U. (2021). Microstructures of potato protein hydrogels and aerogels produced by thermal crosslinking and supercritical drying. *Food Hydrocolloids*, 112, 106305.
- AOAC. Official methods of analysis. (1990). 15º edición. Arlington, Virginia, USA. Association of Official Analytical Chemists, INC.
- Arntfield, S. D., & Murray, E. D. (1981). The influence of processing parameters on food protein functionality. I. Differential scanning calorimetry as an indicator of protein denaturation. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 14, 289–294.
- Avanza, M. V., Acevedo, B. A., Chaves, M. G., Aphalo, P., & Añón, M. C. (2015). Physicochemical and structural properties of major protein fractions of two varieties of NEA-cowpea (*Vigna unguiculata* L.): a comparative study. *International Journal of Food and Nutritional Science*, 4(4), 240–247.
- Avanza, M. V., Puppo, M. C., & Añón, M. C. (2005b). Structural Characterization of Amaranth Protein Gels. *Journal of Food Science*, 70, 223-229.
- Badui Dergal S. (2013). Química de los Alimentos. 5º edición. Pearson.
- Barac, M. B., Pesic, M. B., Stanojevic, S. P., Kostic, A. Z., & Bivolarevic, V. (2015). Comparative study of the functional properties of three legume seed isolates: adzuki, pea and soy bean. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 2779-2787.
- Beck, S. M., Knoerzer, K., & Arcot, J. (2017). Effect of low moisture extrusion on a pea protein isolate's expansion, solubility, molecular weight distribution and secondary structure as determined by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). *Journal of Food Engineering*, 214, 166–174.
- Bera, M.B., & Mukherjee, R.K. (1989). Solubility, Emulsifying, and Foaming Properties of Rice Bran Protein Concentrates. *Journal of Food Science*, 54(1), 142–145.
- Bergeron, V., & Walstra, P. (2005). Foams. En: J. Lykleman (Ed.). *Fundamentals of interface and colloid science, Soft colloids*, vol. 5. Elsevier.

- Blum, H., Beier, H., & Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8(2), 93-99.
- Bolontrade, A. J., Scilingo, A. A., & Añón, M. C. (2013). Amaranth proteins foaming properties: adsorption kinetics and foam formation—part 1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 105, 319-327.
- Bolontrade, A. J., Scilingo, A. A., & Añón, M. C. (2016). Amaranth proteins foaming properties: Film rheology and foam stability—Part 2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 141, 643-650.
- Bourne, M. C. (1968). Texture profile of ripening pears. *Journal of Food Science*, 33, 223-226.
- Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43:414-431
- Britten, M., & Giroux, H. J. (1991). Coalescence index of protein-stabilised emulsions. *Journal of Food Science*, 56, 792-795.
- Britten, M., & Giroux, H. J. (2001). Acid-induced gelation of whey protein polymers: effects of pH and calcium concentration during polymerization. *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 609-617.
- Bryant, C. M., & McClements, D. J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science & Technology*, 9(4), 143-151.
- Cabezas, D. M., Madoery, R., Diehl, B. W. K., & Tomás, M. C. (2012). Emulsifying properties of hydrolyzed sunflower lecithins by phospholipases A2 of different sources. En Benjamin Valdez (Ed.). *Food Industrial Processes - Methods and Equipment*, 39-50. InTech Europe.
- Calvo, C., & Duran, L. (2002). Propiedades físicas II. Ópticas y color. *Tecnología de Alimentos*. CYTED. Vol. 1.
- Carbonaro, M., Grant, G., Cappelloni, M., & Pusztai, A. (2000). Perspectives into factors limiting in vivo digestion of legume proteins: Antinutritional compounds or storage proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 742-749.
- Carbonaro, M., Maselli, P., Dore, P. & Nucara A. (2008). Application of Fourier transform infrared spectroscopy to legume seed flour analysis. *Food Chemistry*, 108(1), 361-368.
- Carbonaro, M., Maselli, P., & Nucara, A. (2012). Relationship between digestibility and

Referencias Bibliográficas

- secondary structure of raw and thermally treated legume proteins: A Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study. *Amino Acids*, 43(2): 911–921.
- Carbonaro, M., Maselli, P., & Nucara, A. (2015). Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food Research International*, 76, 19-30.
- Cardamone, M., & Puri, N.K. (1992). Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins. *Biochemical Journal*, 282(2), 589–593.
- Carp, D. J. (2001). Formación y estabilidad de espumas de proteínas de soja: efecto de la desnaturalización térmica y de la interacción con polisacáridos. Tesis Doctoral Universidad de Buenos Aires.
- Carrera Sánchez, C., & Rodríguez Patino, J. M. (2005). Interfacial, foaming and emulsifying characteristics of sodium caseinate as influenced by protein concentration in solution. *Food Hydrocolloids*, 19(3), 407-416.
- Castillo-Gómez, C., Narváez-Solarte, W., & Hahn-von-Hessberg, C. M. (2016). Agromorphology and uses of *Cajanus cajan* L. Millsp. (Fabaceae). *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 20(1), 52-62.
- Chang, C., Tu, S., Ghosh, S., & Nickerson, M. T. (2015). Effect of pH on the inter-relationships between the physicochemical, interfacial and emulsifying properties for pea, soy, lentil and canola protein isolates. *Food Research International*, 77, 360–367.
- Chatterjee, A., & Mandal, D. K. (2003). Denaturant-induced equilibrium unfolding of concanavalin A is expressed by a three-state mechanism and provides an estimate of its protein stability. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1648, 174–183.
- Cheftel, J. C., Cuq, J. L., & Lorient, D. (1989). Proteínas Alimentarias: bioquímica, propiedades funcionales, valor nutricional, modificaciones químicas. Acribia.
- Clark, A. H., & Ross-Murphy, S. B. (1987). Structural and Mechanical Properties of Biopolymer Gels. *Advances in Polymer Science*, 83, 60-192.
- Coffmann, C. W., & Garcia, V. V. (1977). Functional properties and amino acid content of a protein isolate from mung bean flour. *Journal of Food Science & Technology*, 12, 473-484.
- Cui, L., Bandillo, N., Wang, Y., Ohm, J. B., Chen, B., & Rao, J. (2020). Functionality and structure of yellow pea protein isolate as affected by cultivars and extraction pH. *Food Hydrocolloids*, 108, 106008.
- Curtis, R. A., & Lue, L. (2006). A molecular approach to bioseparations: protein-protein and protein-salt interactions. *Chemical Engineering Science*, 61(3), 907-923.

- Damodaran, S. (1988). Refolding of thermally unfolded soy proteins during the cooling regime of the gelation process: effect on gelation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(2), 262-269.
- Damodaran, S. (1989). Interrelationship of Molecular and Functional Properties of Food Proteins. En J. E. Kinsella, & W. G. Soucie (Eds.). *Food Proteins*, 21-51. American Oil Chemists' Society
- Damodaran, S. (2005). Protein stabilization of emulsions and foams. *Journal of Food Science*, 70(3), R54-R66.
- Damodaran, S. (2010). Aminoácidos, péptidos y proteínas. En O. R. Fennema (Ed.). *Química de los alimentos*. Acribia.
- Damodaran, S., & Kinsella, J. E. (1981). The effect of neutral salts on the stability of macromolecules. *Journal of Biological Chemistry*, 256, 3394e3398.
- Day, L. (2013). Proteins from land plants—potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science & Technology*, 32(1), 25-42.
- Deleu, L. J., Lambrecht, M. A., Van de Vondel, J., & Delcour, J. A. (2019). The impact of alkaline conditions on storage proteins of cereals and pseudo-cereals. *Current opinion in food science*, 25, 98-103.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17(1): 25–39.
- Diedericks, C. F., de Koning, L., Jideani, V. A., Venema, P., & van der Linden, E. (2019). Extraction, gelation and microstructure of Bambara groundnut vicilins. *Food Hydrocolloids*, 97, 105226.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C.W. (2016). InfoStat versión 2016. Córdoba, Argentina: FCA, Universidad Nacional de Córdoba.
- Ellis, A. L., & Lazidis, A. (2018). Foams for food applications. En T.J. Gutiérrez (Ed.). *Polymers for Food Applications*, 271-327. Springer, Cham.
- Errington, A. D., & Foegeding, E. A. (1998). Factors determining fracture stress and strain of fine-stranded whey protein gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(8), 2963-2967.
- Fabian, H., & Mäntele, W. (2006). Infrared Spectroscopy of Proteins. En P. Griffiths, & J. M. Chalmers (Ed.). *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, 5: 3399-3425. John Wiley & Sons.
- FAO. 2018. Legumbres. Pequeñas semillas, grandes soluciones. Ciudad de Panamá.

Referencias Bibliográficas

- FAO. (2021). Base de datos estadísticos FAOSTAT. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/en/#compare>
- Fameau, A. L., & Salonen, A. (2014). Effect of particles and aggregated structures on the foam stability and aging. *Comptes Rendus Physique*, 15(8-9), 748-760.
- Fasoyiro, S. B., Ajibade, S. R., Saka, J. O., Ashaye, O. A., Obatolu, V. A., Farinde, E. O., & Afolabi, O. O. (2005). Physical characteristics and effects of processing methods on pigeon pea varieties. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 3(3/4), 59.
- Felix, M., Cermeño, M., Romero, A., & FitzGerald, R. J. (2019a). Characterisation of the bioactive properties and microstructure of chickpea protein-based oil in water emulsions. *Food Research International*, 121, 577-585.
- Felix, M., Isurrealde, N., Romero, A., & Guerrero, A. (2018). Influence of pH value on microstructure of oil-in-water emulsions stabilized by chickpea protein flour. *Food Science and Technology International*, 24(7), 555–563.
- Félix, M., Romero, A., Carrera-Sánchez, C., & Guerrero, A. (2019b). A comprehensive approach from interfacial to bulk properties of legume protein-stabilized emulsions. *Fluids*, 4(2), 65.
- Felix, M., Perez-Puyana, V., Romero, A., & Guerrero, A. (2017). Development of thermally processed bioactive pea protein gels: Evaluation of mechanical and antioxidant properties. *Food and Bioproducts Processing*, 101, 74-83.
- Fennema, O. R. (1996). Food Chemistry. Marcel Dekker.
- Fligner, K. L., & Mangino, M. E. (1991). Relationship of composition to protein functionality. En K.L. Fligner & M.E. Mangino (Ed.). *Interactions of food proteins*, 1-12. American Chemical Society.
- Freifelder, D. (1976). Physical biochemistry; applications to biochemistry and molecular biology. WH Freeman and Company.
- Freitas, R. L., Teixeira, A. R., & Ferreira, R. B. (2004). Characterization of the proteins from *Vigna unguiculata* seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(6), 1682-1687.
- Fuller, D. Q., Murphy, C., Kingwell-Banham, E., Castillo, C. C., & Naik, S. (2019). *Cajanus cajan* (L.) Millsp. origins and domestication: the South and Southeast Asian archaeobotanical evidence. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 66, 1175–1188.
- Gallegos Tintoré, S., Pacheco Aguirre, J., Betancur Ancona, D., & Chel Guerrero, L. (2004). Extraction and characterization of soluble protein fractions from *Phaseolus lunatus* L seeds. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1), 81-88

- Gao, Z., Shen, P., Lan, Y., Cui, L., Ohm, J. B., Chen, B., & Rao, J. (2020). Effect of alkaline extraction pH on structure properties, solubility, and beany flavor of yellow pea protein isolate. *Food Research International*, 131, 109045.
- Ge, J., Sun, C. X., Mata, A., Corke, H., Gan, R. Y., & Fang, Y. (2021). Physicochemical and pH-dependent functional properties of proteins isolated from eight traditional Chinese beans. *Food Hydrocolloids*, 112, 106288.
- Giraudo, M., Scollo, D., Ugarte, M., Landriel, M., & García D. (2011). Las emulsiones y los alimentos II. Ediciones de la UNLa. Universidad Nacional de Lanús.
- Gómez, A., Gay, C., Tironi, V., & Avanza, M. V. (2021). Structural and antioxidant properties of cowpea protein hydrolysates. *Food Bioscience*, 41, 101074.
- Gonzalez Foutel, N., Chaves, M. G., Avanza, M. V. (2014). Germinación de semillas de guandú: efecto sobre propiedades nutricionales, antinutricionales y funcionales. *V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos* (CICYTAC 2014).
- Gorinstein, S., Delgado-Licon, E., Pawelzik, E., Permady, H. H., Weisz, M., & Trakhtenberg, S. (2001). Characterization of Soluble Amaranth and Soybean Proteins Based on Fluorescence, Hydrophobicity, Electrophoresis, Amino Acid Analysis, Circular Dichroism, and Differential Scanning Calorimetry Measurements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5595–5601.
- Gumus, C. E., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2017). Formation and stability of ω -3 oil emulsion-based delivery systems using plant proteins as emulsifiers: Lentil, pea, and faba bean proteins. *Food Biophysics*, 12(2), 186-197.
- Halling, P. J., & Walstra, P. (1981). Protein-stabilized foams and emulsions. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 15(2), 155-203.
- Heertje, I. (1993). Structure and function of food products: a review. *Food Structure*, 12(3), 7.
- Hermansson, A. M. (1979). Methods of studying functional characteristics of vegetables proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(3Part2), 272-279.
- Hermansson, A. M. (1994). Microstructure of protein gels related to functionality. En R. Y. Yada, R. L. Jackman & J. L. Smith (Ed.). *Protein structure-function relationships in foods*. Blackie Academic and Professional.
- Hermansson, A. M., & Langton, M. (1994). Electron microscopy. En S. B. Ross-Murphy. (Ed). *Physical Techniques for the study of Food Biopolymers*. Springer.
- Horax, R., Hettiarachchy, N.S., Chen, P., & Jalaluddin, M. (2004). Preparation and Characterization of Protein Isolate from Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.).

Referencias Bibliográficas

- Journal of Food Science*, 69(2),114–118.
- ICRISAT. (2021). International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. Disponible en: <http://exploreit.icrisat.org/profile/Pigeonpea/279>
- Ivanova, D., Barrett, J., Wiedenhofer, D., Macura, B., Callaghan, M., & Creutzig, F. (2020). Quantifying the potential for climate change mitigation of consumption options. *Environmental Research Letters*, 15(9), 093001.
- Jarpa-Parra, M., Bamdad, F., Wang, Y., Tian, Z., Temelli, F., Han, J., & Chen, L. (2014). Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2), 461–469.
- Jiang, L., Wang, Z., Li, Y., Meng, X., Sui, X., Qi, B., & Zhou, L. (2015). Relationship between surface hydrophobicity and structure of soy protein isolate subjected to different ionic strength. *International Journal of Food Properties*, 18(5), 1059-1074.
- Jin, J., Ma, H., Wang, K., Yagoub, A.E-G.A., Owusu, J., Qu, W., He, R., Zhou, C., & Ye, X. (2015). Effects of multi-frequency power ultrasound on the enzymolysis and structural characteristics of corn gluten meal. *Ultrasonics Sonochemistry*, 24, 55 –64.
- Johnston, S. P., Nickerson, M. T., & Low, N. H. (2015). The physicochemical properties of legume protein isolates and their ability to stabilize oil-in-water emulsions with and without genipin. *Journal of food science and technology*, 52(7), 4135-4145.
- Joshi, M., Adhikari, B., Aldred, P., Panozzo, J. F., Kasapis, S., & Barrow, C. J. (2012). Interfacial and emulsifying properties of lentil protein isolate. *Food chemistry*, 134(3), 1343-1353.
- Joye, I. J., & McClements, D. J. (2014). Emulsifying and emulsion-stabilizing properties of gluten hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(12), 2623-2630.
- Kannan, A., Hettiarachchy, N. S., Sato, K., & Marshall, M. R. (2012). Food Proteins and Peptides: Structure-function relationship. En N. S. Hettiarachchy, K. Sato, M. R. Marshall & A. Kannan (Ed.). *Food Proteins and Peptides: chemistry, functionality, interactions, and commercialization*, 49-93. CRC Press.
- Karaca, A.C., Low, N., & Nickerson, M. (2011). Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International*, 44(9), 2742–2750.
- Khalid, I. I., & Elhardallou, S. B. (2015). The effect of pH on foaming properties of cowpea (*Vigna unguiculata* L. walp) flour and protein isolates. *Journal of Nutrition and Food Sciences*, 5(4), 1000385.

- Khandelwal, S., Udupi, S. A., & Ghugre, P. (2010). Polyphenols and tannins in Indian pulses: Effect of soaking, germination and pressure cooking. *Food Research International*, 43(2), 526-530.
- Khatoon, N., Prakash, J. (2006). Nutrient retention in microwave cooked germinated legumes. *Food Chemistry*, 97(1), 115-121.
- Kinsella, J. E. (1979). Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(3Part1), 242-258.
- Kong, J., & Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8), 549-559.
- Konishi, Y., Horikawa, K., Oku, Y., Azumaya , J., & Nakatani, N. (1991). Extraction of two albumin fractions from amaranth grains: comparison of some physicochemical properties and the putative localization in the grains. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(11):1745-1750.
- Krishna T.G., Mitra R.K., Bhatia C.R. (1977). Seed globulins of *Cajanus cajan*. *Plant Foods for Human Nutrition*, 27:313-325.
- Krishna, T., & Bhatia, C. (1985). Vicilin from *Cajanus cajan* seeds. *Phytochemistry*, 24(10), 2201–2203.
- Krishnan, H. B., Natarajan, S. S., Oehrle, N. W., Garrett, W. M., & Darwish, O. (2017). Proteomic Analysis of Pigeonpea (*Cajanus cajan*) Seeds Reveals the Accumulation of Numerous Stress-Related Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(23), 4572–4581.
- Kumar, C. S., Naik, S. S., Mohan, N., Saxena, R. K., & Varshney, R. K. (2017). Botanical description of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. En R. K. Varshney, R. K. Saxena, & S. A. Jackson (Ed.). *The Pigeonpea Genome*, 17-29. Springer, Cham.
- Ladjal-Ettoumi, Y., Boudries, H., Chibane, M., & Romero, A. (2015). Pea, Chickpea and Lentil Protein Isolates: Physicochemical Characterization and Emulsifying Properties. *Food Biophysics*, 11, 43–51.
- Ladjal-Ettoumi, Y., Chibane, M., & Romero, A. (2016). Emulsifying properties of legume proteins at acidic conditions: Effect of protein concentration and ionic strength. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 260-266.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lafarga, T., Álvarez, C., Villaró, S., Bobo, G., & Aguiló-Aguayo, I. (2019). Potential of pulse-derived proteins for developing novel vegan edible foams and emulsions.

Referencias Bibliográficas

- International Journal of Food Science and Technology*, 55(2), 475–481.
- Lakowicz, J. R. (2006). Principles of fluorescence spectroscopy. Springer Science Business Media.
- Langton, M., Ehsanzamir, S., Karkehabadi, S., Feng, X., Johansson, M., & Johansson, D. P. (2020). Gelation of faba bean proteins-Effect of extraction method, pH and NaCl. *Food Hydrocolloids*, 103, 105622.
- Law, H. Y., Choi, S. M., & Ma, C. Y. (2008). Study of conformation of vicilin from *Dolichos lablab* and *Phaseolus calcarius* by Fourier-transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Food Research International*, 41(7): 720–729.
- Lawal, O. S. (2004). Functionality of African locust bean (*Parkia biglobossa*) protein isolate: effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. *Food Chemistry*, 86(3), 345-355.
- Li, P., Wen, J., Ma, X., Lin, F., Jiang, Z., & Du, B. (2018). Structural, functional properties and immunomodulatory activity of isolated Inca peanut (*Plukenetia volubilis* L.) seed albumin fraction. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 1931–1941.
- Li-Chan, E. C. Y., & Ma, C. Y. (2002). Thermal analysis of flaxseed (*Linum usitatissimum*) proteins by differential scanning calorimetry. *Food Chemistry*, 77(4), 495–502.
- Liang, H. N., & Tang, C. H. (2013). pH-dependent emulsifying properties of pea [*Pisum sativum* (L.)] proteins. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 309-319.
- Liu, Y., Hu, X., Ye, Y., Wang, M., & Wang, J. (2020). Emulsifying properties of wheat germ: Influence of pH and NaCl. *Food Hydrocolloids*, 100, 105431.
- Liu, Y., Zhao, G., Ren, J., Zhao, M., & Yang, B. (2011). Effect of denaturation during extraction on the conformational and functional properties of peanut protein isolate. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(3), 375-380.
- Loisel, W., Guéguen, J., & Popineau, Y. (1993). A new apparatus for analyzing foaming properties of proteins. En 4° *Symposium on Food proteins: Structure and functionality*. 320-323. VCH Publishers.
- Lorient, D., Colas, B., & Le Meste, M. (1988). Propriétés fonctionnelles des macromolécules alimentaires. Les Cahiers de l'ENSBANA, Lavoisier Technique & documentation.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement

- wiht folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Maheshwaran, P., Arun Raj, M., Ragu, K., Premalatha, A., & Vetrivel, M. (2019). Assessment of suitable redgram (*Cajanus cajan*) variety for yield and yield characteristics in rainfed region of Theni district. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(6), 336-338.
- Makeri, M. U., Mohamed, S. A., Karim, R., Ramakrishnan, Y., & Muhammad, K. (2017). Fractionation, physicochemical, and structural characterization of winged bean seed protein fractions with reference to soybean. *International Journal of Food Properties*, 20(sup2), 2220-2236.
- 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.
- Mao, Y., & McClements, D. J. (2011). Modulation of bulk physicochemical properties of emulsions by hetero-aggregation of oppositely charged protein-coated lipid droplets. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1201-1209.
- Martin, A. H., Nieuwland, M., & de Jong, G. A. (2014). Characterization of heat-set gels from RuBisCO in comparison to those from other proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(44), 10783-10791.
- Mawal, Y., Mawal, M., & Ranjekar, P. (1990). Unusual denaturation properties of vicilin from *Cajanus cajan*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 166(3), 1446–1452.
- McClements, D.J. (2012). Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(5), 235–245.
- McClements, D. J. (2016). Food Emulsions. Principles, practices, and techniques. Taylor & Francis Group.
- McClements, D. J., Bai, L., & Chung, C. (2017). Recent advances in the utilization of natural emulsifiers to form and stabilize emulsions. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8, 205-236.
- Meng, G. T., Ching, K. M., & Ma, C. Y. (2002). Thermal aggregation of globulin from an indigenous Chinese legume, *Phaseolus angularis* (red bean). *Food Chemistry*, 79(1), 93-103.
- Mizubuti, I. Y., Júnior, O. B., de Oliveira Souza, L. W., & Ida, E. I. (2000). Response surface methodology for extraction optimization of pigeon pea protein. *Food Chemistry*, 70(2), 259-265.

Referencias Bibliográficas

- Molina, M. I., Petruccelli, S., & Añón, M. C. (2004). Effect of pH and ionic strength modifications on thermal denaturation of the 11S globulin of sunflower (*Helianthus annuus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(19), 6023-6029.
- Molina Ortiz, S. E., & Wagner, J. R. (2002). Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. *Food Research International*, 35(6), 511-518.
- Momen, S., Alavi, F., & Aider, M. (2021). Alkali-mediated treatments for extraction and functional modification of proteins: Critical and application review. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 778-797.
- Montich, G. G. (2013). Espectroscopía infrarroja en el estudio de proteínas y membranas lipídicas. En B. Córsmico, L. J. Falomir Lockhart, G.R. Franchini, & N. Scaglia (Ed.). *Ánálisis estructural y funcional de Macromoléculas*, 76-97. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata.
- Mula, M. G., & Saxena, K. B. (2010). Lifting the Level of Awareness on Pigeonpea – A Global Perspective. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT).
- Mundi, S., & Aluko, R. E. (2012). Physicochemical and functional properties of kidney bean albumin and globulin protein fractions. *Food Research International*, 48(1), 299-306.
- Munialo, C. D., van der Linden, E., Ako, K., & de Jongh, H. H. (2015). Quantitative analysis of the network structure that underlines the transitioning in mechanical responses of pea protein gels. *Food Hydrocolloids*, 49, 104-117.
- Mwasaru, M. A., Muhammad, K., Bakar, J., & Man, Y. B. C. (1999a). Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. I. Physicochemical properties. *Food Chemistry*, 67(4): 435–443.
- Mwasaru, M. A., Muhammad, K., Bakar, J., & Man, Y. B. C. (1999b). Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. II. Functional properties. *Food Chemistry*, 67(4), 445–452.
- Mwasaru, M. A., Muhammad, K., Bakar, J., & Man, Y. B. C. (2000). Influence of altered solvent environment on the functionality of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. *Food Chemistry*, 71(2), 157-165.
- Nadal, P., Canela, N., Katakis, I., & O'Sullivan, C. K. (2011). Extraction, isolation, and

- characterization of globulin proteins from *Lupinus albus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2752-2758.
- Navarro, C. L., Restrepo, D., & Perez, J. (2014). El guandul (*Cajanus cajan*) una alternativa en la industria de los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(2), 197-206.
- Nemati, M., Oveis, M. R., Abdollahi, H., & Sabzevari, O. (2004). Differentiation of bovine and porcine gelatins using principal component analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34(3), 485-492.
- Obala, J., Saxena, R. K., Singh, V. K., Kumar, C. V., Saxena, K. B., Tongoona, P., ... & Varshney, R. K. (2019). Development of sequence-based markers for seed protein content in pigeonpea. *Molecular Genetics and Genomics*, 294(1), 57-68.
- Odeny, D. A. (2007). The potential of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) in Africa. *Natural Resources Forum*, 31, 297–305.
- Oomah, B. D., Patras, A., Rawson, A., Singh, N., & Compos-Vega, R. (2011). Chemistry of pulses. En *Processing, Quality and Nutraceutical Applications*, 9-55. Elsevier Inc.
- Oshodi, A. A., Olaofe, O., & Hall, G. M. (1993). Amino acid, fatty acid and mineral composition of pigeon pea (*Cajanus cajan*). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 43(4), 187-191.
- 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.
- Paredes, F. A., Bogado, H. R. (2015). Manual del cultivo de guandú (*Cajanus cajan* L. Millsp.) para la agricultura familiar del norte de corrientes. Ediciones INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria).
- Petruccelli, S., & Añón, M. C. (1995). Soy Protein Isolate Components and their Interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(7), 1762-1767.
- Peyrano, F., Speroni, F., & Avanza, M. V. (2016). Physicochemical and functional properties of cowpea protein isolate treated with temperature or high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, 38–46.
- Peyrano, F., de Lamballerie, M., Avanza, M. V., & Speroni, F. (2017). Calorimetric Study of Cowpea Protein Isolates. Effect of Calcium and High Hydrostatic Pressure. *Food Biophysics*, 12(3), 374–382.
- Peyrano, F., De Lamballerie, M., Speroni, F., & Avanza, M. V. (2019). Rheological characterization of thermal gelation of cowpea protein isolates: Effect of processing

Referencias Bibliográficas

- conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 109, 406-414.
- Peyrano, F., de Lamballerie, M., Avanza, M. V., & Speroni, F. (2021). Gelation of cowpea proteins induced by high hydrostatic pressure. *Food Hydrocolloids*, 111, 106191.
- Peyrano, F., de Lamballerie, M., Avanza, M. V., & Speroni, F. (2022). High hydrostatic pressure-or heat-induced gelation of cowpea proteins at low protein content: effect of calcium concentration. *Food Hydrocolloids*, 124, 107220.
- Pilosof, A. M. R. (2000a). Solubilidad. En A. M. R. Pilosof, & G. B. Bartholomai (Ed.). *Caracterización funcional y estructural de proteínas*, 31-40. Eudeba. CYTED.
- Pilosof, A. M. R. (2000b). Gelificación. En A. M. R. Pilosof, & G. B. Bartholomai (Ed.). *Caracterización funcional y estructural de proteínas*, 75-95. Eudeba. CYTED.
- Pilosof, A. M. R., & Bartholomai, G. B. (2000). Caracterización funcional y estructural de proteínas. Eudeba. CYTED.
- Piornos, J. A., Burgos-Díaz, C., Ogura, T., Morales, E., Rubilar, M., Maureira-Butler, I., & Salvo-Garrido, H. (2015). Functional and physicochemical properties of a protein isolate from AluProt-CGNA: A novel protein-rich lupin variety (*Lupinus luteus*). *Food Research International*, 76, 719-724.
- Pojić, M., Mišan, A., & Tiwari, B. (2018). Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 93-104.
- Potin, F., Lubbers, S., Husson, F., & Saurel, R. (2019). Hemp (*Cannabis sativa* L.) protein extraction conditions affect extraction yield and protein quality. *Journal of Food Science*, 84(12), 3682-3690.
- Praderes, G., García, A., & Pacheco, E. (2009). Caracterización físico-química y propiedades funcionales de harina de quinchoncho (*Cajanus cajan*) obtenida por secado en doble tambor rotatorio. *Revista de la Facultad de Agronomía (UCV)*, 35(2), 79-84.
- Prema, L., & Kurup, P.A. (1973). Effect of protein fractions from *Cajanus cajan* (redgram) and *Dolichos biflorus* (horsegram) on the serum, liver and aortic lipid levels in rats fed a high-fat-high-cholesterol diet. *Atherosclerosis*, 18(3): 369-377.
- Privalov, P. L., & Khechinashvili, N. N. (1974). A Thermodynamic Approach to the Problem of Stabilization of Globular Protein Structure: A Calorimetric Study. *Journal of Molecular Biology*, 86(3), 665-684.
- Puppo, M. C. (1997). Propiedades gelificantes de las proteínas de soja a pH ácido. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata.

- Puppo, M. C., & Añón, M. C. (1998). Structural properties of heat-induced soy protein gels as affected by ionic strength and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3583-3589
- Puppo, M. C., Lupano, C. E., & Añón, M. C. (1995). Gelation of Soybean Protein Isolates in Acidic Conditions. Effect of pH and Protein Concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2356-2361.
- Quiroga, A., Martínez, E. N., Rogniaux, H., Geairon, A., & Añón, M. C. (2009). Globulin-p and 11S-globulin from *Amaranthus hypochondriacus*: Are two isoforms of the 11S-globulin. *Protein Journal*, 28(9–10), 457–467.
- Rahmati, N. F., Koocheki, A., Varidi, M., & Kadkhodaee, R. (2018). Introducing Speckled sugar bean (*Phaseolus vulgaris*) protein isolates as a new source of emulsifying agent. *Food Hydrocolloids*, 79, 498-508.
- Renkema, J. M. (2004). Relations between rheological properties and network structure of soy protein gels. *Food hydrocolloids*, 18(1), 39-47.
- Renkema, J. M., Lakemond, C. M., De Jongh, H. H., Gruppen, H., & van Vliet, T. (2000). The effect of pH on heat denaturation and gel forming properties of soy proteins. *Journal of Biotechnology*, 79(3), 223-230.
- Ribeiro, A. C., Teixeira, A. R., & Ferreira, R. B. (2004). Characterization of globulins from common vetch (*Vicia sativa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4913-4920.
- Rosa, M.J.S, Ferreira, R.B., & Teixeira, A.R. (2000). Storage proteins from *Lathyrus sativus* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5432–5439.
- Rubio, L. A., Pérez, A., Ruiz, R., Guzmán, M. Á., Aranda-Olmedo, I., & Clemente, A. (2013). Characterization of pea (*Pisum sativum*) seed protein fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(2), 280-287.
- Ruiz-Henestrosa, V. P., Carrera Sánchez, C., Escobar, M. D. M. Y., Pedroche Jiménez, J. J., Rodríguez Millán, F., & Rodríguez Patino, J. M. (2007). Interfacial and foaming characteristics of soy globulins as a function of pH and ionic strength. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 309(1-3), 202-215.
- Salager, J. L.; Andérez, J. M. & Forgiarini, A. (2003). Influencia de la formulación sobre las espumas. Cuaderno FIRP 263-A. Universidad de Los Andes, Venezuela.
- Salminen, H., & Weiss, J. (2014). Electrostatic adsorption and stability of whey protein–pectin complexes on emulsion interfaces. *Food Hydrocolloids*, 35, 410-419.
- Sameer Kumar, C.V., Satheesh Naik, S.J., Mohan, N., Saxena, R.K., & Varshney, R.K.

Referencias Bibliográficas

- (2017). Botanical Description of Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. En R.K. Varshney, R.K. Saxena., S.A. Jackson (Ed). *The Pigeonpea Genome, Compendium of Plant Genomes*, 17-29. Springer International Publishing AG.
- Sari, Y. W., Mulder, W. J., Sanders, J. P., & Bruins, M. E. (2015). Towards plant protein refinery: review on protein extraction using alkali and potential enzymatic assistance. *Biotechnology journal*, 10(8), 1138-1157.
- Sathe, S. K. (2012). Protein solubility and functionality. En En N. S. Hettiarachchy, K. Sato, M. R. Marshall & A. Kannan (Ed.). *Food Proteins and Peptides: chemistry, functionality, interactions, and commercialization*, 95-124. CRC Press.
- Sathe, S. K., & Venkatachalam, M. (2007). Fractionation and biochemical characterization of moth bean (*Vigna aconitifolia* L.) proteins. *LWT-Food Science and Technology*, 40(4), 600-610.
- Saxena, K.B., Kumar, R. V., & Rao P. V. (2002). Pigeonpea Nutrition and Its Improvement. *Journal of Crop Production*, 5:1-2, 227-260
- Shand, P. J., Ya, H., Pietrasik, Z., & Wanasundara, P. K. J. P. D. (2007). Physicochemical and textural properties of heat-induced pea protein isolate gels. *Food Chemistry*, 102(4), 1119-1130.
- Shevkani, K., Singh, N., Kaur, A., & Rana, J. C. (2015). Structural and functional characterization of kidney bean and field pea protein isolates: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 43, 679-689.
- Shewry, P. R., Napier, J. A., & Tatham, A. S. (1995). Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *The plant cell*, 7(7), 945.
- Shirley, B. A. (1995). Protein Stability and Folding. Theory and Practice. Ed. Humana Press Inc.
- Schramm, L. L. (2005). Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications (1º edición). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Singh, M., Trivedi, N., Enamala, M. K., Kuppam, C., Parikh, P., Nikolova, M. P., & Chavali, M. (2021). Plant-based meat analogue (PBMA) as a sustainable food: a concise review. *European Food Research and Technology*, 1-28.
- Singh, U. (1984). The inhibition of digestive enzymes by polyphenols of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh]. *Nutrition Report International*, 29, 745-753.
- Singh, U., & Jambunathan, R. (1982). Distribution of seed protein fractions and amino acids in different anatomical parts of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and pigeonpea

- (*Cajanus cajan* L.). *Plant Food for Human Nutrition*, 31, 347–354.
- Singh, U., Jambunathan, R., Saxena, K., & Subrahmanyam, N. (1990). Nutritional quality evaluation of newly developed high-protein genotypes of pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 50(2): 201–209.
- Sridharan, S., Meinders, M.B.J., Bitter, J.H., & Nikiforidis, C.V. (2020). Pea flour as stabilizer of oil-in-water emulsions: Protein purification unnecessary. *Food Hydrocolloids*, 101, 105533.
- Steffe, J. F. (1996). Introduction to rheology. En J. F. Steffe (Ed.). *Rheological methods in food process engineering*, 1-93. Freeman Press.
- Stone, A. K., Karalash, A., Tyler, R. T., Warkentin, T. D., & Nickerson, M. T. (2015). Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food Research International*, 76, 31-38.
- Stumpe, M. C., & Grubmu, H. (2007). Interaction of Urea with Amino Acids: Implications for Urea-induced protein denaturation. *Journal of the American Chemical Society*, 129(51), 16126–16131.
- Suarez, S. E., & Añón, M. C. (2018). Comparative behaviour of solutions and dispersions of amaranth proteins on their emulsifying properties. *Food Hydrocolloids*, 74, 115-123.
- Sun, X., Ohanenye, I.C., Ahmed, T., & Udenigwe, C.C. (2020). Microwave treatment increased protein digestibility of pigeon pea (*Cajanus cajan*) flour: Elucidation of underlying mechanisms. *Food Chemistry*, 329, 127196.
- Sun, X. D., & Arntfield, S. D. (2011). Dynamic oscillatory rheological measurement and thermal properties of pea protein extracted by salt method: Effect of pH and NaCl. *Journal of Food Engineering*, 105(3), 577-582.
- Sun, X. D., & Arntfield, S. D. (2012). Molecular forces involved in heat-induced pea protein gelation: effects of various reagents on the rheological properties of salt-extracted pea protein gels. *Food Hydrocolloids*, 28(2), 325-332.
- Taha, A., Ahmed, E., Hu, T., Xu, X., Pan, S., & Hu, H. (2019). Effects of different ionic strengths on the physicochemical properties of plant and animal proteins-stabilized emulsions fabricated using ultrasound emulsification. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 58, 104627.
- Talari, A., & Shakappa, D. (2018). Role of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) in human nutrition and health: A review. *Asian Journal of Dairy & Food Research*, 37(3), 212-220.

Referencias Bibliográficas

- Tan, J. (2019). Overview: Semisolid Foods. En H.S. Joyner (Ed). *Rheology of Semisolid Food*, 31-62. Springer, Cham.
- Tang, C. H., & Sun, X. (2011). A comparative study of physicochemical and conformational properties in three vicilins from Phaseolus legumes: Implications for the structure-function relationship. *Food Hydrocolloids*, 25(3), 315–324.
- Tang, C. H., & Wang, X. Y. (2010). Physicochemical and structural characterisation of globulin and albumin from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds. *Food Chemistry*, 121(1), 119–126.
- Tanger, C., Engel, J., & Kulozik, U. (2020). Influence of extraction conditions on the conformational alteration of pea protein extracted from pea flour. *Food Hydrocolloids*, 107, 105949.
- Tanger, C., Müller, M., Andlinger, D., & Kulozik, U. (2022). Influence of pH and ionic strength on the thermal gelation behaviour of pea protein. *Food Hydrocolloids*, 123, 106903.
- Tapal, A., Vedarud, G. E., Sreedhara, A., & Tiku, P. K. (2019). Nutraceutical protein isolate from pigeon pea (*Cajanus cajan*) milling waste by-product: Functional aspects and digestibility. *Food & Function*, 10(5), 2710-2719.
- Templeman, T. S., DeMaggio, A. E., & Stetler, D. A. (1987). Biochemistry of fern spore germination: globulin storage proteins in *Matteuccia struthiopteris* L. *Plant physiology*, 85(2), 343-349.
- Tian, Y., Taha, A., Zhang, P., Zhang, Z., Hu, H., & Pan, S. (2021). Effects of protein concentration, pH, and NaCl concentration on the physicochemical, interfacial, and emulsifying properties of β -conglycinin. *Food Hydrocolloids*, 118, 106784.
- Torres, A., Frias, J., Granito, M., & Vidal-Valverde, C. (2007). Germinated *Cajanus cajan* seeds as ingredients in pasta products: Chemical, biological and sensory evaluation. *Food Chemistry*, 101(1), 202-211.
- Totosaus, A., Montejano, J. G., Salazar, J. A., & Guerrero, I. (2002). A review of physical and chemical protein-gel induction. *International Journal of Food Science & Technology*, 37(6), 589-601.
- Trigui, I., Yaich, H., Zouari, A., Cheikh-Rouhou, S., Blecker, C., Attia, H., & Ayadi, M. A. (2021). Structure-function relationship of black cumin seeds protein isolates: Amino-acid profiling, surface characteristics, and thermal properties. *Food Structure*, 29, 100203.
- Utsumi, S., & Kinsella, J. E. (1985a). Forces involved in soy protein gelation: effects of

- various reagents on the formation, hardness and solubility of heat-induced gels made from 7S, 11S, and soy isolate. *Journal of Food Science*, 50(5), 1278-1282.
- Utsumi, S., & Kinsella, J. E. (1985b). Structure-function relationships in food proteins: subunit interactions in heat-induced gelation of 7S, 11S, and soy isolate proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(2), 297-303.
- Varshney, R. K., Chen, W., Li, Y., Bharti, A.K., Saxena, R. K, Schlueter, J. A., ... Jackson, S. A. (2012). Draft genome sequence of pigeonpea (*Cajanus cajan*), an orphan legume crop of resource-poor farmers. *Nature Biotechnology*, 30(1), 83-89.
- Vázquez, G., Fontenla, E., Santos, J., Freire, M. S., González-Álvarez, J., & Antorrena, G. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial crops and products*, 28(3), 279-285.
- Ventureira, J. L. (2010). Propiedades estructurales y funcionales de preparados proteicos de amaranto modificados y soja-amaranto. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Völp, A. R., Seitz, J., & Willenbacher, N. (2021). Structure and rheology of foams stabilized by lupin protein isolate of *Lupinus angustifolius*. *Food Hydrocolloids*, 106919.
- Wagner, J. R. (2000). Propiedades superficiales. En A. M. R. Pilosof, & G. B. Bartholomai (Ed.). *Caracterización funcional y estructural de proteínas*, 41-74. Eudeba. CYTED.
- 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.
- Were, L., Hettiarachchy, L., & Kalapathy, U. (1997). Modified soy proteins with improved foaming and water hydration properties. *Journal of Food Science*, 62(4), 821-824.
- Wright, D. J., Hemmant, J. W. (1987). Foaming properties of protein solutions: Comparison of large-scale whipping and conductimetric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 41(4), 361-371.
- Wu, D., & Sun, D. W. (2013). Colour measurements by computer vision for food quality control - A review. *Trends in Food Science and Technology*, 29(1), 5-20.
- Xu, Y., Huang, Q., Fu, X., & Jane, J. L. (2015). Modification of starch octenylsuccinate by β -amylase hydrolysis in order to increase its emulsification properties. *Food Hydrocolloids*, 48, 55-61.
- Xu, Y., Obielodan, M., Sismour, E., Arnett, A., Alzahrani, S., & Zhang, B. (2017).

Referencias Bibliográficas

- Physicochemical, functional, thermal and structural properties of isolated Kabuli chickpea proteins as affected by processing approaches. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 1147–1154.
- Yin, S. W., Tang, C. H., Yang, X. Q., & Wen, Q. B. (2011). Conformational study of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate (KPI) by tryptophan fluorescence and differential scanning calorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 241–248.
- 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.
- Zhang, T., Jiang, B., & Wang, Z. (2007). Gelation properties of chickpea protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 21(2), 280-286.
- Zhang, Y. H., Tang, C. H., Wen, Q. B., Yang, X. Q., Li, L., & Deng, W. L. (2010). Thermal aggregation and gelation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate at pH 2.0: Influence of ionic strength. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 266–274.
- Zhao, Z. K., Mu, T. H., Zhang, M., & Richel, A. (2018). Chemical forces, structure, and gelation properties of sweet potato protein as affected by pH and high hydrostatic pressure. *Food and Bioprocess Technology*, 11(9), 1719-1732.
- Zhou, M., Liu J., Zhou Y., Huang X., Liu F., Pan S., & Hu H. (2016). Effect of high intensity ultrasound on physicochemical and functional properties of soybean glycinin at different ionic strengths. *Innovative Food Science Emerging Technologies*, 34, 205–213.
- Zhou, J. Z., Zhang, H., Gao, L., Wang, L., & Qian, H. F. (2015). Influence of pH and ionic strength on heat-induced formation and rheological properties of cottonseed protein gels. *Food and Bioproducts Processing*, 96, 27-34.
- Zuidema, H., & Waters, G. (1941). Ring method for determination of interfacial tension. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 13(5), 312-313.

ANEXO

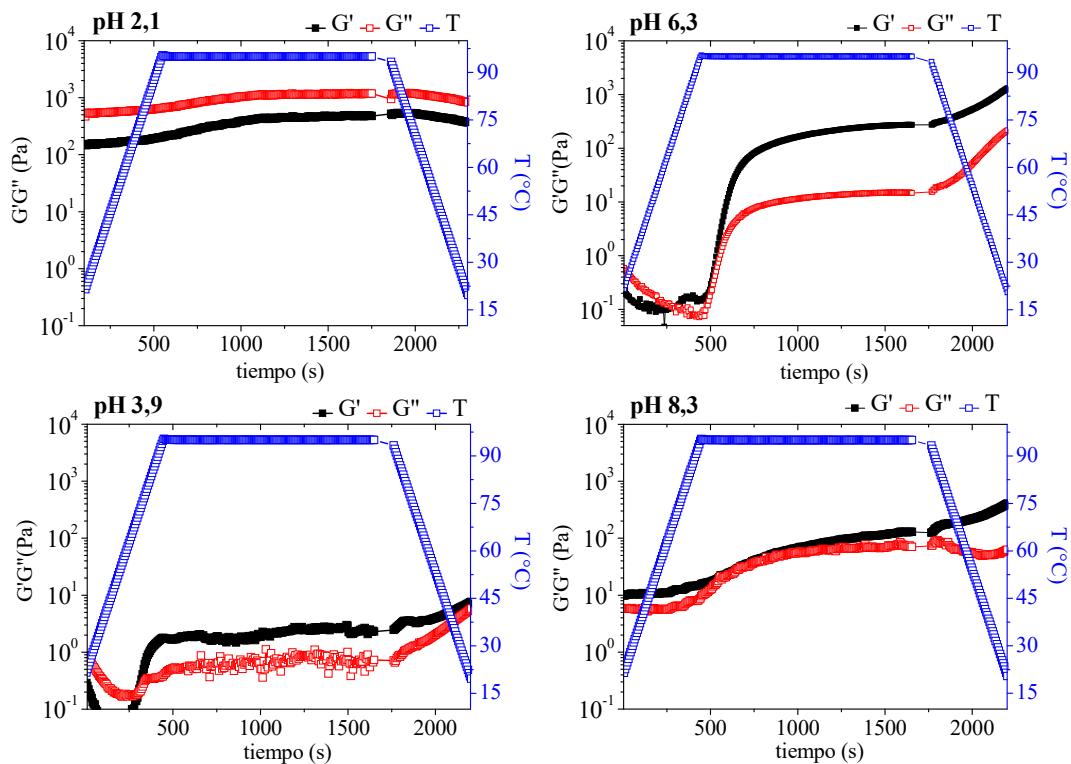


Figura A.1: Módulos G' y G'' y temperatura en función del tiempo para dispersiones de A8 al 8,0% p/p de proteína a distinto pH ($\mu=0,10$).

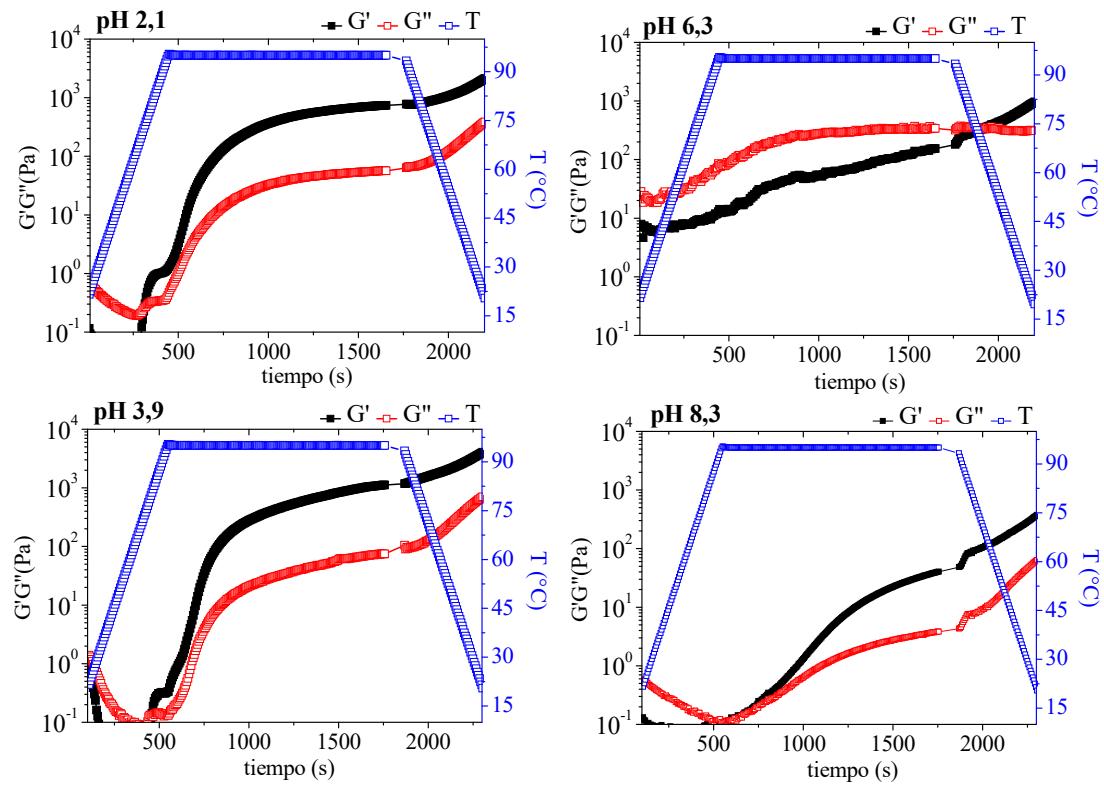


Figura A.2: Módulos G' y G'' y temperatura en función del tiempo para dispersiones de A8 al 8,0% p/p de proteína a distinto pH ($\mu = 0,54$).