



Universidad Nacional del Litoral

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del Grado Académico de Doctor en Química
En el campo de Ciencia y Tecnología de Alimentos

ESPUMADO DE PROTEINAS DE SUERO LACTEO EN PRESENCIA DE POLISACARIDOS

Lic. Adrián A. Perez

**Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química,
Universidad Nacional del Litoral**

**Director: MSc. Liliana G. Santiago
Codirector: Dra. Amelia C. Rubiolo**

**Miembros del Jurado: Dra. María Cristina Añón
Dra. Ana María R. Pilosof
Dr. Luis M. Gugliotta**

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Liliana G. Santiago y a mi codirectora Amelia C. Rubiolo por el esfuerzo y tiempo que dedicaron para poder hacer posible este trabajo, por la maravillosa orientación científica, confianza, predisposición para escuchar mis problemas ante diversas dificultades y sobre todo, por el cariño recibido.

A Juan M. Rodríguez Patino y Cecilio Carrera Sánchez por su valiosa orientación científica durante mis pasantías de investigación en el Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Química dependiente de la Universidad de Sevilla (España).

A Enrique J. Mammarella (INTEC-CONICET) por su valiosa colaboración en la obtención de hidrolizados de WPI. A Jose M. Pellegrino (IFISE-CONICET) por su colaboración en la obtención de micrografías confocales. A Mario Candiotti (INLAIN-CONICET) por su colaboración en la técnica de caracterización electroforética.

Al Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA) de la Facultad de Ingeniería Química (FIQ) dependiente de la Universidad Nacional del Litoral (UNL), por brindarme el espacio para desarrollar mis actividades de investigación.

Al soporte económico de los siguientes proyectos: CAI+D-2005 (12H429) y CAI+D-2009 tipo II PI 57-283 de la UNL, PICTO-2005-(36237) de la Agencia Nacional de Promoción de Científica y Tecnológica de la Argentina (ANPCyT), P06-AGR-01535 de la Junta de Andalucía (Plan Andaluz de Investigación) y 105PI0274 del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET) por el otorgamiento de becas internas de postgrado tipo I y II. Al Centro Argentino Brasileño de Nanociencia y Nanotecnología (CABNN) y al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (MINCyT) y a los organismos: CYTED, Asociación Argentina de Materiales (SAM), Asociación de Universidades del Grupo Montevideo (AUGM), Agencia Córdoba Ciencia S.E. y especialmente a la Universidad de Granada (España) por el otorgamiento de becas para mi formación académica y para la exposición y divulgación de los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral.

A mis compañeros y amigos del Grupo de Biocoloides: Virginia Castel, Javier Gazpoz, Julia Spotti, Silvana Fioramonti, Oscar Andrich y Elena Aringoli por la calidez y contención recibida durante estos últimos años. A mis colegas del INTEC Bárbara Meza y María Laura Olivares por su generosidad y constante estímulo.

A los afectos de mi vida: Mariana, María Julia, Ofelia, Mateo y Leo. A mis queridos padres Julio y Graciela por haberme formado como persona, por su amor infinito y por enseñarme que las metas en la vida se alcanzan sobre la base del esfuerzo y la confianza en uno mismo.

RESUMEN

Las propiedades espumantes de las proteínas de suero lácteo derivan de su fuerte tendencia a adsorberse sobre la interfase aire-agua. Sin embargo, las variaciones en composición y funcionalidad, generalmente, limitan su aplicación de estas proteínas en la formulación de productos espumados estandarizados. Por lo tanto, las estrategias de formulación que permitan la existencia de interacciones sinérgicas entre proteínas y otros aditivos alimenticios, tales como los polisacáridos, así como también la aplicación de tecnologías adecuadas que den lugar a la modificación estructural de proteínas, tales como la hidrólisis enzimática, podrían plantearse como alternativas para ampliar la utilización de las mismas como ingredientes funcionales de productos espumados.

En este contexto, el objetivo de la presente Tesis Doctoral fue investigar desde un punto de vista básico y aplicado el impacto de la adición de polisacáridos aniónicos (PS) y de la hidrólisis enzimática limitada sobre las propiedades espumantes de proteínas de suero lácteo para reunir el conocimiento que permita el desarrollo de ingredientes funcionales que puedan ser incorporados en productos alimenticios espumados. Para ello, se realizaron diferentes estudios en solución acuosa (espectroscopía de fluorescencia y absorción, entre otros), en la interfase aire-agua (tensiometría dinámica y en el equilibrio, reología dilatacional superficial) y en espumas, en condiciones de pH neutro y baja fuerza iónica (0,05 M).

En primer lugar, se estudió el efecto de la adición de dos tipos de polisacáridos aniónicos no superficialmente activos (PS), alginato de sodio (AS) y λ -carragenina (λ -C), sobre las propiedades interfaciales y espumantes de un concentrado de proteínas de suero lácteo industrial (WPC). Las propiedades interfaciales y espumantes del WPC puro y de los

sistemas mixtos (WPC/PS) fueron comparadas con las de un aislado proteico de suero lácteo (WPI), considerado en este estudio como una referencia. En ausencia de PS, el WPC presentó una pobre capacidad espumante, la que fue relacionada con su elevado contenido de grasa residual. Sin embargo, la adición de PS, mejoró la formación y la estabilidad de las espumas de WPC, alcanzando, en algunos casos, un comportamiento comparable con el WPI. Los resultados pudieron explicarse en términos de la existencia de distintas interacciones macromoleculares (segregación y/o complejación) entre el WPC y los PS, tanto en la subfase acuosa como en el entorno interfacial, cuya naturaleza dependieron del tipo de PS y de su concentración en solución.

En segundo lugar, se estudió el efecto de una hidrólisis enzimática limitada sobre las propiedades interfaciales y espumantes de un WPI. La hidrólisis enzimática mejoró las propiedades espumantes del WPI alcanzando un máximo a nivel de un grado de hidrólisis (GH) de 3,0 %. Este hallazgo fue vinculado con la modificación de las características moleculares (tamaño molecular, hidrofobicidad expuesta) e interfaciales (cinéticas y reológicas) del WPI como consecuencia del clivaje enzimático.

Por último, se estudió el efecto de la adición de los PS (AS y λ -C) sobre las propiedades interfaciales y espumantes de hidrolizados de WPI. La adición de PS provocó diferentes efectos sobre las propiedades espumantes de los hidrolizados de acuerdo con la dinámica de interacción entre los biopolímeros, tanto en la subfase acuosa como en el entorno de la interfase aire-agua. Así, la naturaleza de estas interacciones afectó el comportamiento espumante de los hidrolizados de WPI dependiendo del tipo de PS, de su concentración en solución acuosa, del GH y/o de la acción combinada de estos factores.

A partir de los resultados encontrados, se concluye que la presente Tesis Doctoral podría aportar conocimientos básicos y aplicados de actual interés para la industria alimentaria. Los avances en el desarrollo de nuevos ingredientes a partir de proteínas de suero lácteo, ya sea mediante estrategias de formulación (adición de PS), hidrólisis enzimática limitada y/o combinación de ambas, podrían diversificar y aumentar su utilización beneficiando a este sector industrial.

INDICE

Capítulo 1	
INTRODUCCION.....	1
1.1. PERSPECTIVA ACTUAL DE LA FORMULACION DE ALIMENTOS.....	2
1.2. ESPUMAS ALIMENTICIAS.....	3
1.3. INGREDIENTES TENSIOACTIVOS.....	6
1.4. INGREDIENTES BIOPOLIMERICOS.....	9
1.4.1. Proteínas del suero lácteo.....	10
1.4.1.1. Suero lácteo.....	10
1.4.1.2. Principales fracciones de proteínas de suero lácteo.....	13
1.4.1.3. Obtención industrial de proteínas de suero lácteo.....	17
1.4.1.4. Aplicaciones y funcionalidad.....	20
1.4.1.5. Propiedades interfaciales.....	22
1.4.1.6. Mejoramiento de la funcionalidad.....	23
1.4.2. Polisacáridos.....	26
1.4.2.1. Características generales.....	26
1.4.2.2. Alginatos.....	28
1.4.2.3. Carrageninas.....	30
	33
1.5. INTERACCIONES ENTRE INGREDIENTES BIOPOLIMERICOS.....	
 Capítulo 2	
OBJETIVOS.....	39
 Capítulo 3	
FUNDAMENTOS TEORICOS.....	42
3.1. BASES MOLECULARES Y TERMODINAMICAS DEL COMPORTAMIENTO DE INTERACCION ENTRE PROTEINAS Y POLISACARIDOS EN SOLUCION ACUOSA.....	43
3.1.1. Comportamiento individual de biopolímeros en solución acuosa.....	43
3.1.1.1. Estructura y conformación.....	43
3.1.1.2. Interacciones hidrofóbicas.....	47
3.1.1.3. Interacciones electrostáticas.....	48
3.1.1.4. Enlace o puente de hidrógeno.....	50
3.1.1.5. Solapamiento estérico e interacciones de van de Waals.....	52
3.1.1.6. Puentes disulfuro.....	53
3.1.1.7. Entropía configuracional.....	54
3.1.1.8. Interacciones con el agua.....	56
3.1.2. Comportamiento de interacción entre biopolímeros en solución acuosa.....	60
3.1.2.1. Aspectos termodinámicos.....	60
3.1.2.2. Incompatibilidad termodinámica.....	65

3.1.2.3. Coacervación compleja.....	67
3.1.2.4. Miscibilidad.....	68
3.2. FUNDAMENTOS DEL COMPORTAMIENTO INTERFACIAL DE PROTEINAS.....	69
3.2.1. Tensión interfacial.....	69
3.2.2. Adsorción interfacial.....	70
3.2.2.1. Actividad superficial y fuerza impulsora.....	70
3.2.2.2. Cinética de adsorción.....	73
3.2.3. Propiedades mecánicas.....	76
3.3. FUNDAMENTOS DEL COMPORTAMIENTO ESPUMANTE DE PROTEINAS.....	78
3.3.1. Sistemas coloidales.....	78
3.3.2. Concepto termodinámico y cinético de estabilidad coloidal.....	80
3.3.3. Espumas alimenticias.....	83
3.3.4. Formación de espumas.....	85
3.3.5. Estabilidad de espumas.....	87
3.3.6. Proceso de desestabilización de espumas.....	88
3.3.6.1. Drenaje.....	89
3.3.6.2. Difusión o desproporción.....	91
3.3.6.3. Colapso o coalescencia.....	92
Capítulo 4 MATERIALES Y METODOS.....	96
4.1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS POLISACARIDOS SOBRE LA DINAMICA MOLECULAR DE PROTEINAS DE SUERO LACTEO EN SOLUCION ACUOSA.....	97
4.1.1. Materiales.....	97
4.1.1.1. Proteínas de suero lácteo.....	97
4.1.1.2. Hidrolizados de WPI	101
4.1.1.3. Polisacáridos.....	105
4.1.2. Técnicas de caracterización.....	105
4.1.2.1. Solubilidad.....	105
4.1.2.2. Calorimetría diferencial de barrido.....	106
4.1.2.3. Cromatografía líquida de alta presión.....	106
4.1.2.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	107
4.1.2.5. Porcentaje de proteína nativa y desnaturalizada.....	108
4.1.3. Determinación de las interacciones macromoleculares.....	109
4.1.3.1. Preparación de dispersiones.....	109
4.1.3.2. Preparación de los sistemas mixtos.....	109
4.1.3.3. Espectroscopía de fluorescencia.....	110
4.1.3.4. Espectroscopía de absorción UV/Vis.....	111

4.1.3.5. Microscopía de fluorescencia confocal.....	113
4.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS POLISACARIDOS SOBRE LA ADSORCION INTERFACIAL DE PROTEINAS DE SUERO LACTEO.....	113
4.2.1. Presión superficial en el equilibrio.....	113
4.2.1.1. Descripción del dispositivo experimental y principio de funcionamiento.....	114
4.2.1.2. Procedimiento experimental.....	115
4.2.2. Presión superficial dinámica.....	116
4.2.2.1. Descripción del dispositivo experimental y principio de funcionamiento.....	117
4.2.2.2. Procedimiento experimental.....	119
4.2.3. Modelo cinético de adsorción interfacial.....	121
4.2.3.1. Etapa de difusión.....	121
4.2.3.2. Etapas de penetración y reordenamiento.....	123
4.2.4. Reología interfacial de películas de proteínas de suero lácteo.....	124
4.3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS POLISACARIDOS SOBRE LAS PROPIEDADES DE ESPUMADO DE PROTEINAS DE SUERO LACTEO.....	126
4.3.1. Descripción del dispositivo experimental y principio de funcionamiento.....	126
4.3.2. Procedimiento experimental.....	128
Capítulo 5	
RESULTADOS Y DISCUSION.....	132
5.1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADICION DE POLISACARIDOS SOBRE LAS PROPIEDADES INTERFACIALES Y ESPUMANTES DE PROTEINAS DE SUERO LACTEO.....	133
5.1.1. Efecto de la adición de polisacáridos sobre la dinámica molecular del WPC en solución acuosa.....	133
5.1.1.1. Efecto de los PS sobre la fluorescencia intrínseca del WPC.....	134
5.1.1.2. Efecto de los PS sobre la fluorescencia extrínseca del WPC.....	139
5.1.1.3. Interacciones electrostáticas entre el WPC y los PS.....	142
5.1.1.4. Efecto de los PS sobre la ultraestructura del WPC.....	153
5.1.2. Efecto de la adición polisacáridos sobre la dinámica interfacial del WPC.....	160
5.1.2.1. Propiedades superficiales del WPC en el equilibrio.....	160
5.1.2.2. Efecto de los PS sobre la formación de películas de WPC.....	162
5.1.2.3. Efecto de los PS sobre la cinética de adsorción interfacial del WPC.....	165
5.1.2.4. Efecto de los PS sobre las propiedades dilatacionales superficiales de las películas de WPC.....	175
5.1.2.5. Efecto de los PS sobre la estructuración interfacial del WPC.....	179

5.1.3. Efecto de la adición de polisacáridos sobre las propiedades espumantes del WPC.....	186
5.1.3.1. Efecto de los PS sobre la formación de espumas de WPC.....	188
5.1.3.2. Efecto de los PS sobre la estabilidad de espumas de WPC.....	192
5.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA HIDROLISIS ENZIMÁTICA LIMITADA SOBRE LAS PROPIEDADES INTERFACIALES Y ESPUMANTES DE PROTEÍNAS DE SUERO LACTEO.....	197
5.2.1. Efecto de la hidrólisis enzimática limitada sobre la dinámica molecular del WPI en solución acuosa.....	198
5.2.1.1. Efecto del GH sobre la fluorescencia intrínseca del WPI.....	198
5.2.1.2. Efecto del GH sobre la fluorescencia extrínseca del WPI.....	200
5.2.2. Efecto de la hidrólisis enzimática limitada sobre la dinámica interfacial del WPI.....	202
5.2.2.1. Efecto del GH sobre las propiedades superficiales del WPI en el equilibrio.....	202
5.2.2.2. Efecto del GH sobre la dinámica de formación de películas de WPI.....	204
5.2.2.3. Efecto del GH sobre la cinética de adsorción interfacial del WPI.....	205
5.2.2.4. Efecto del GH sobre las propiedades dilatacionales superficiales de películas de WPI.....	208
5.2.2.5. Efecto del GH sobre la estructuración interfacial del WPI.....	211
5.2.3. Efecto de la hidrólisis enzimática limitada sobre las propiedades espumantes de WPI.....	212
5.2.3.1. Efecto del GH sobre la formación de espumas de WPI.....	212
5.2.3.2. Efecto del GH sobre la estabilidad de espumas de WPI.....	215
5.3. ESTUDIO DE LA ADICIÓN DE POLISACÁRIDOS SOBRE LAS PROPIEDADES INTERFACIALES Y ESPUMANTES DE HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS DE SUERO LACTEO.....	219
5.3.1. Efecto de la adición de polisacáridos sobre la dinámica molecular de hidrolizados de WPI en solución acuosa.....	219
5.3.1.1. Efecto de los PS sobre la fluorescencia intrínseca de hidrolizados de WPI.....	219
5.3.1.2. Efecto de los PS sobre la fluorescencia extrínseca de hidrolizados de WPI.....	222
5.3.2. Efecto de la adición de polisacáridos sobre la dinámica interfacial de hidrolizados de WPI.....	225
5.3.2.1. Efecto de los PS sobre la dinámica de formación de películas de hidrolizados de WPI.....	225
5.3.2.2. Efecto de los PS sobre la cinética de adsorción interfacial de hidrolizados de WPI.....	228
5.3.2.3. Efecto de los PS sobre las características dilatacionales superficiales de películas de hidrolizados de WPI.....	237

5.3.2.4. Efecto de los PS sobre la estructuración interfacial de hidrolizados de WPI.....	243
5.3.3. Efecto de la adición polisacáridos sobre las propiedades espumantes de hidrolizados de WPI.....	248
5.3.3.1. Efecto de los PS sobre la formación de espumas de hidrolizados de WPI.....	248
5.3.3.2. Efecto de los PS sobre la estabilidad de espumas de hidrolizados de WPI.....	254
Capítulo 6	
CONCLUSIONES.....	262
NOMENCLATURA.....	269
APENDICES.....	279
BIBLIOGRAFIA.....	290

Capítulo 1

INTRODUCCION

1.1. PERSPECTIVA ACTUAL DE LA FORMULACION DE ALIMENTOS

La producción de alimentos a escala industrial, la formulación de otros nuevos y la adecuación de los tradicionales a la evolución de las nuevas exigencias de consumo, requieren además de la aplicación de nuevas tecnologías, la utilización de ingredientes con funcionalidad específica. Desde un punto de vista tecnológico, estos ingredientes deben permitir el mejoramiento de los atributos de calidad, facilitar la producción automatizada y a gran escala de productos uniformes, con una vida media adecuada a las necesidades de uso, y que puedan soportar el transporte y almacenamiento, hasta que tenga lugar su consumo.

La producción masiva ha conducido a la disponibilidad de una amplia gama de alimentos de bajo costo, que son rápidos y fáciles de preparar, y por lo tanto, atractivos para el consumidor moderno. Sin embargo, la producción eficiente de alimentos de alta calidad depende del conocimiento del verdadero aporte de los ingredientes a las propiedades globales del producto. Este hecho ha conducido a que los fabricantes de alimentos tengan que desarrollar una comprensión más profunda acerca del comportamiento individual y conjunto de los ingredientes antes, durante y después de la producción ([Hollingsworth, 1995](#)). Este conocimiento es necesario por una serie de razones:

(i) Las propiedades de los ingredientes funcionales alimenticios suelen variar de lote a lote. Por lo tanto, los fabricantes de alimentos deben utilizar su conocimiento sobre el comportamiento de los mismos en diferentes condiciones, con el fin de ajustar las operaciones de procesamiento y estandarizar las propiedades del producto final.

(ii) Existe una tendencia creciente hacia el mejoramiento de la calidad y variedad de alimentos procesados (Sloan, 1994, 1996). Por lo tanto, el conocimiento de las propiedades de los ingredientes puede permitir a los científicos desarrollar alimentos de manera más racional.

(iii) Hay una tendencia creciente hacia la eliminación o reducción de componentes asociados con problemas de salud, tales como grasa, sal y colesterol (Sloan, 1994, 1996). Sin embargo, la eliminación de determinados ingredientes puede provocar cambios significativos en las propiedades de los alimentos que son percibidos como indeseables por parte de los consumidores (O'Donnell, 1995). Por lo tanto, es importante comprender el rol que juega cada ingrediente en la determinación de las propiedades fisicoquímicas, organolépticas y sensoriales de los alimentos.

Las propiedades funcionales de distintos ingredientes de los alimentos se pueden evaluar, en principio, en sistemas modelo bajo condiciones experimentales controladas. A partir del conocimiento del comportamiento y propiedades de los sistemas modelos se puede avanzar hacia el estudio de sistemas más complejos para finalmente lograr la formulación de productos que sean viables para su producción industrial.

1.2. ESPUMAS ALIMENTICIAS

Muchos alimentos naturales o procesados que se producen y comercializan son dispersiones o han consistido en una dispersión durante alguna de las etapas de su producción. La mayoría de estas dispersiones se presentan bajo la forma de espumas, emulsiones y/o una combinación de ambas (Dickinson, 1992; McClements, 1998).

El estudio de las espumas (sistemas gas-líquido) ha derivado de un creciente interés tecnológico de la industria alimentaria debido a que dichos sistemas proveen texturas deseables en una gran variedad de productos tradicionales, tales como helados, cremas, merengues, bebidas espumantes, productos de panadería y confitería, etc. (Dickinson, 1992) o de productos nuevos, como alimentos con bajo contenido en grasas e instantáneos, formulaciones con bajo o elevado contenido de alcohol, alimentos funcionales (alimentos infantiles, con valores nutricionales específicos), etc.

Las espumas alimenticias no se forman espontáneamente. Para producirlas se requiere el aporte de energía mecánica para incrementar el área interfacial alrededor de las burbujas de gas. Debido a la gran cantidad de superficie libre que presentan, las espumas son sistemas termodinámicamente inestables. Sin embargo, desde un punto de vista práctico es posible producir una espuma cinéticamente estable (o metaestable) por un cierto periodo de tiempo, que es el que exige el consumidor para cada producto en cuestión. Para ello, se han de incluir en la formulación determinadas sustancias conocidas como ingredientes tensioactivos o agentes espumantes (Dickinson, 1992; McClements, 1998).

El proceso de formación de espumas y su estabilidad son dos fenómenos que no se pueden evaluar de manera independiente puesto que paralelamente a la formación de una espuma tienen lugar los mecanismos de desestabilización (Langevin, 2000). La estabilidad frecuentemente es afectada por mecanismos tales como el drenaje de líquido (incluyendo el drenaje gravitacional y la regeneración marginal), desproporción (difusión de gas desde las burbujas más pequeñas hacia las más grandes), y coalescencia (destrucción de la burbuja por ruptura de la *lamella*) (Figura 1.1). La concurrencia de estos fenómenos acaba con la destrucción final de la espuma. Por lo tanto, el

conocimiento de los factores que gobiernan la formación y estabilidad de las mismas es muy importante dado que estos mecanismos no solo controlan la vida útil de muchos alimentos sino también afectan a la textura y, consecuentemente, a la percepción sensorial de los mismos (Wilde, 2000).

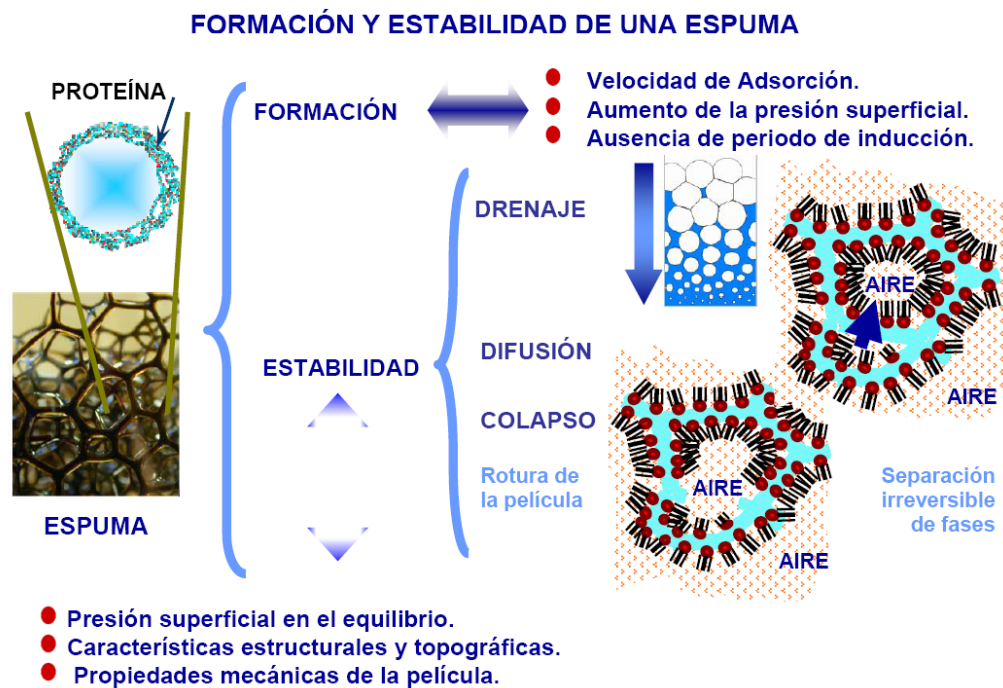


Figura 1.1. Influencia de las propiedades de la película superficial sobre la formación y estabilización de una espuma.

La presencia de un agente tensioactivo o espumante en la disolución acuosa, promueve la formación de una bicapa de moléculas anfifílicas adsorbidas sobre la superficie de las burbujas, de tal manera que la energía superficial del sistema disminuye. Así, durante el proceso de espumado, la formación de esta película delgada determina la estabilidad de la espuma frente a la coalescencia y la ruptura de las

burbujas de gas inicialmente formadas (Dickinson, 1992, 2001, 2003; Foedeging y col., 2006; Rodríguez Patino y col., 2008). Por lo tanto, las propiedades espumantes dependen fuertemente de las propiedades superficiales y mecánicas de las películas de moléculas tensioactivas adsorbidas sobre la interfase aire-agua. La velocidad de adsorción interfacial se considera de gran relevancia en la formación de espumas alimenticias (Damodaran, 1990; Dickinson, 1992). Además, durante la adsorción, la reducción de la tensión superficial de la interfase del sistema se considera un requisito muy importante, tanto para optimizar el consumo de energía involucrado en el proceso de espumado como para lograr un tamaño de burbuja pequeño, factor que determina la estabilidad y el periodo de vida útil del producto (Damodaran, 1990; Dickinson, 1992). Individualmente, algunos ingredientes tensioactivos, pueden producir espumas estables, pero en la práctica, dado que los alimentos son sistemas multicomponentes, el estudio de los parámetros de formación y estabilidad de espumas se complica, por lo que debe realizarse de manera sistemática (Dickinson, 2003).

1.3. INGREDIENTES TENSIOACTIVOS

Los alimentos espumados contienen una gran variedad de ingredientes o componentes que interactúan unos con otros, ya sea física o químicamente, determinando las propiedades fisicoquímicas, organolépticas y sensoriales del producto final (Friberg y Larsson, 1997, Dickinson y Stainsby, 1982, Dickinson, 1992).

En los últimos años, el rol de diversos agentes tensioactivos o espumantes en la formación y estabilidad de espumas alimenticias ha sido intensamente estudiado (Murray y Ettelaie, 2004; Guzey y McClements, 2007; Dickinson, 2006; Rodríguez

Patino y col., 2008). Los ingredientes tensioactivos, comúnmente utilizados en la formulación de espumas alimenticias, son moléculas anfifílicas que poseen una parte polar y otra no polar. Para minimizar la energía libre del sistema, las moléculas tensioactivas tienden a orientarse en la interfase aire-agua, de manera que sus grupos hidrofílicos se localizan en la subfase acuosa y la parte hidrofóbica en la fase gaseosa (Damodaran, 1990; Dickinson, 1992; McClements, 1998).

En general, se pueden distinguir dos clases de moléculas tensioactivas capaces de estabilizar espumas alimenticias (Wilde, 2000): (i) tensioactivos de bajo peso molecular, tales como lípidos, fosfolípidos y algunos tensioactivos sintéticos permitidos y (ii) biopolímeros o tensioactivos de alto peso molecular, tales como las proteínas y algunos polisacáridos superficialmente activos (Figura 1.2).

En un sentido amplio, el uso óptimo de ingredientes tensioactivos en procesos de espumado, es solo posible con un buen conocimiento de su comportamiento interfacial, incluyendo sus propiedades de equilibrio y dinámicas, asociadas a su adsorción sobre la interfase aire-agua (Wilde, 2000; Murray, 2002). Además, el comportamiento interfacial de los mismos (adsorción, características mecánicas, etc.) depende de sus propiedades fisicoquímicas (tamaño, forma, composición, estructura química, distribución de carga, etc.), las que pueden ser afectadas por factores extrínsecos del medio acuoso (pH, fuerza iónica, temperatura, etc.) (Rodríguez Niño y col., 2002).

El análisis de las características interfaciales de estos agentes espumantes es de importancia práctica, porque las películas interfaciales constituyen modelos bien definidos para el análisis de las espumas alimenticias a niveles microscópicos y nanoscópicos, con numerosas ventajas para realizar estudios fundamentales (Horne y

Rodríguez Patino, 2003; Rodríguez Patino y col., 2003 y 2007; Wilde, 2000; Mackie y col., 1999, 2000, 2001; Aksenenko y col., 2006).

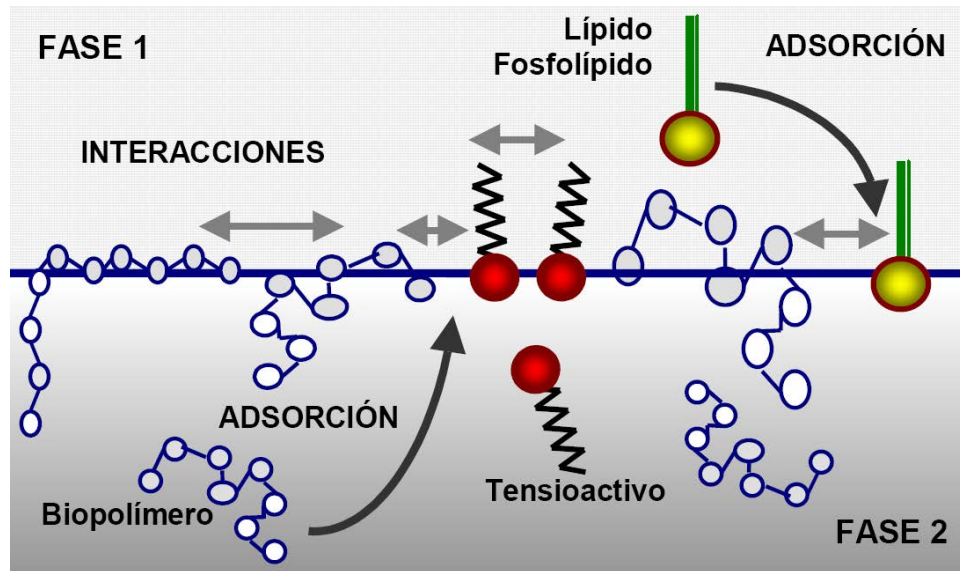


Figura 1.2. Implicaciones de las características interfaciales de las películas interfaciales de emulsionantes alimentarios (biopolímeros, lípidos, fosfolípidos, tensioactivos permitidos, etc.) sobre la formación y estabilidad de una dispersión (emulsión o espuma).

En estos estudios se debe tener siempre presente que el principal objetivo de la industria alimentaria es la de diseñar productos que tengan un impacto positivo en el consumidor. A escala macroscópica las propiedades físicas, tales como la estabilidad, las propiedades reológicas y la textura del alimento se consideran de gran importancia. Finalmente, a un nivel molecular, la forma en la que los ingredientes tensioactivos interactúan entre sí en la propia interfase tiene una gran influencia sobre la formación y estabilidad de las burbujas individuales y sobre la interacción entre ellas (Damodaran, 1990; Dickinson, 1992; McClements, 1998). El componente clave de esta aproximación nanoscópica es la auto-asociación molecular sobre la interfase aire-agua. Por lo tanto,

uno de nuestros objetivos como tecnólogos es el de analizar la forma de mejorar las características macroscópicas de una espuma alimenticia a través del control de la formación de nanoestructuras de agentes espumantes adsorbidos sobre la interfase aire-agua.

1.4. INGREDIENTES BIOPOLIMERICOS

Las proteínas y los polisacáridos son dos tipos de biopolímeros muy utilizados como ingredientes funcionales en la formulación de espumas alimenticias, entre otros sistemas dispersos coloidales (BeMiller y Whistler 1996, Damodaran 1996). Durante y posteriormente a la fabricación, las proteínas junto con los polisacáridos, ejercen una gran influencia contribuyendo a la formación, estabilidad, apariencia, textura y vida útil de las espumas alimenticias (Schmidt y Smith, 1992; Schorsch y col., 1999).

Por lo general, las proteínas muestran una fuerte tendencia a adsorberse sobre la interfase aire-agua y es por ello que se distinguen por sus buenas propiedades espumantes (Mellema y Isenbart, 2004; Dickinson, 2001; Carrera y Rodríguez Patino, 2005). Sin embargo, los polisacáridos debido a su naturaleza más hidrofílica, generalmente, tienden a mantenerse en la solución acuosa controlando la reología de la fase continua como agentes espesantes, gelificantes y estabilizantes (McClements, 2000; Dickinson, 2003).

La elección de los ingredientes biopoliméricos más apropiados para una aplicación en particular constituye una de las decisiones más importantes en la formulación de espumas alimenticias. Por lo tanto, un buen control de las propiedades funcionales y de las interacciones entre componentes de los alimentos es de gran

importancia para el desarrollo de productos y procesos, como así también para lograr nuevas y mejores aplicaciones de estos ingredientes biopoliméricos (Carrera y col., 2005; Foegeding y col., 2006).

A continuación se presenta la importancia, obtención y las principales características de los ingredientes biopoliméricos utilizados para la formulación de los sistemas espumados que son objetos de estudio en la presente Tesis Doctoral.

1.4.1. Proteínas del suero lácteo

1.4.1.1. Suero lácteo

En la formulación de productos alimenticios espumados, el uso de proteínas de suero lácteo está aumentando debido a sus buenas propiedades nutritivas y funcionales.

Las proteínas del suero derivan del suero lácteo obtenido como subproducto de la industria de elaboración de quesos. Básicamente, se distinguen dos tipos de suero lácteo dependiendo del método de elaboración de queso empleado: (i) suero dulce y (ii) suero ácido. La mayor parte del suero lácteo producido mundialmente es suero dulce. Este tipo de suero lácteo proviene de los procesos de elaboración de quesos que involucran la acción proteolítica de enzimas coagulantes (quimosina o renina) sobre las micelas de caseínas (CN) de la leche. Estas enzimas catalizan la ruptura del enlace peptídico de la κ -CN entre los aminoácidos Phe₁₀₅ y Met₁₀₆. Este clivaje provoca la desestabilización coloidal de las micelas y, por lo tanto, la precipitación o coagulación de casi todas las CN formando el queso. El suero dulce es el más empleado por la industria y tiene una composición química bastante constante.

Por otro lado, el suero ácido es obtenido como subproducto de la coagulación ácida o láctica de las micelas de CN a nivel de su punto isoeléctrico (pI), es decir a pH 4,6. Este proceso conduce a una desmineralización de las micelas y a la destrucción de la estructura micelar. El suero ácido es un suero muy mineralizado ya que contiene más del 80% de los minerales de la leche de partida.

El suero de quesería se caracteriza por ser un producto de alto contenido de agua, elevado pH y posee una gran demanda biológica de oxígeno lo que favorece su rápido deterioro. Durante muchos años, la forma más común de desechar el suero ha sido sencillamente verterlo en los cursos de agua siendo esto muy perjudicial para el medio ambiente.

El suero dulce posee aproximadamente 95% de lactosa, 25% de proteínas y 8% de la materia grasa presente en la leche (Smithers y Copeland, 1997). La presencia de estos valiosos nutrientes motivó, desde la antigüedad, la reutilización del suero lácteo para diferentes propósitos siendo su uso tradicional, menos perjudicial, la complementación de la alimentación para ganado bovino y porcino. Por eso, el aprovechamiento de este producto de alto valor nutricional y su utilización en la formulación de nuevos alimentos constituye un verdadero desafío para la industria alimentaria. Argentina posee una larga tradición en la producción y el consumo de productos lácteos, por lo tanto, la investigación y desarrollo para abordar problemáticas relacionadas con la industria láctea mediante el aprovechamiento del suero de quesería, brindan proyecciones económicas interesantes a este sector, relevante en el mercado interno y externo de nuestro país.

La producción mundial de suero lácteo se estima en 118 millones de toneladas, lo que equivale a 7 millones de toneladas de suero en polvo. Sin embargo, se estima que la

producción mundial del suero lácteo en polvo es de 4,3 millones de toneladas (Martín-Diana, 2002, 2005). En los últimos años, las estadísticas oficiales muestran un crecimiento explosivo en la producción de suero en polvo. En efecto, la producción nacional se duplicó entre 2004 y 2007, y habría alcanzado un nuevo récord en 2008 (SAGPyA, 2007; Schaller, 2009).

Se estima que en Argentina existen aproximadamente doce plantas importantes procesadoras de suero lácteo, la mayor parte localizadas en la región pampeana. Las dos firmas más importantes por su capacidad de procesamiento son AFISA (Arla Food Ingredients SA, *joint venture* Arla (Dinamarca)-Sancor (Argentina), localizada en Porteña, Córdoba; y Remotti, con plantas en Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires. Otras empresas son: Verónica S.A., Molfino Hnos. S.A., Mastellone Hnos., Milkaut S.A., García Hnos., Sobrero y Cagnolo, Cotapa, Arcolen, Sucesores de Alfredo Williner, Saputo, Cooperativa de James Craik y Lácteos Conosur. Estas compañías utilizan tecnología de punta y cumplen los más exigentes estándares internacionales, accediendo incluso a certificaciones BPM e ISO.

Por otro lado, el gran crecimiento de la producción nacional vino de la mano de un fuerte impulso de las colocaciones externas. Hoy en día, Argentina se encuentra entre los principales países productores y exportadores de proteínas del suero lácteo. Entre 1999 y 2008 las exportaciones se multiplicaron por once, hasta alcanzar según se estima, un récord del orden de las 36.000 toneladas y U\$S 86 millones en 2008. El 84 % del volumen colocado corresponde al lactosuero y el resto a otros componentes naturales de la leche. El precio promedio para 2008 fue de unos 1600 U\$S/tonelada para el suero en polvo y aproximadamente 6500 U\$S/tonelada para distintos concentrados de proteína (Schaller, 2009).

En resumen, queda claro que el proceso de valorización del suero lácteo se encuentra en pleno auge y que, a pesar de la crisis de los mercados mundiales en estos últimos años, la senda de permanente innovación en tecnología de procesos y productos seguirá siendo transitada por las industrias que además de buscar el mejoramiento de la eficiencia y una mayor rentabilidad, generan divisas genuinas a través de la exportación de productos de alto valor agregado cumpliendo con las normativas ambientales.

1.4.1.2. Principales fracciones de proteínas de suero lácteo

Los componentes del suero lácteo que presentan mayor valor nutricional y funcional son las proteínas. Concretamente, las proteínas del suero suponen alrededor del 20% de las proteínas totales de la leche de vaca. Por definición, se denominan proteínas del suero lácteo a aquellas proteínas que permanecen solubles tras la precipitación isoelectrica de las caseínas (CN) a pH 4,6 y a 20 °C (de Wit, 1981). Son proteínas globulares típicas y, en contraste con las CN, la mayoría de éstas poseen estructura terciaria y cuaternaria. Contienen menor cantidad de Glu y Pro que las CN, pero son ricas en aminoácidos azufrados (Cys, Met) y ramificados (Leu, Val, Ile) (Walzem y col., 2002; Cheftel y col., 1989).

Las principales proteínas del suero lácteo son: β -lactoglobulina (β -LG), α -lactoalbúmina (α -LA) y albúmina sérica bovina (BSA). La estructura tridimensional de las principales fracciones de proteínas del suero lácteo se presenta en la Figura 1.3. También pertenecen a este grupo algunas fracciones proteicas tales como inmunoglobulinas (Ig), el complejo proteosa-peptona (fragmentos proteolíticos

fosforilados de CN), lactoferrina (LF), caseino-glicomacropéptido (GMP), lipoproteínas provenientes de los glóbulos de grasa y varias enzimas (Farrel y col., 2006).

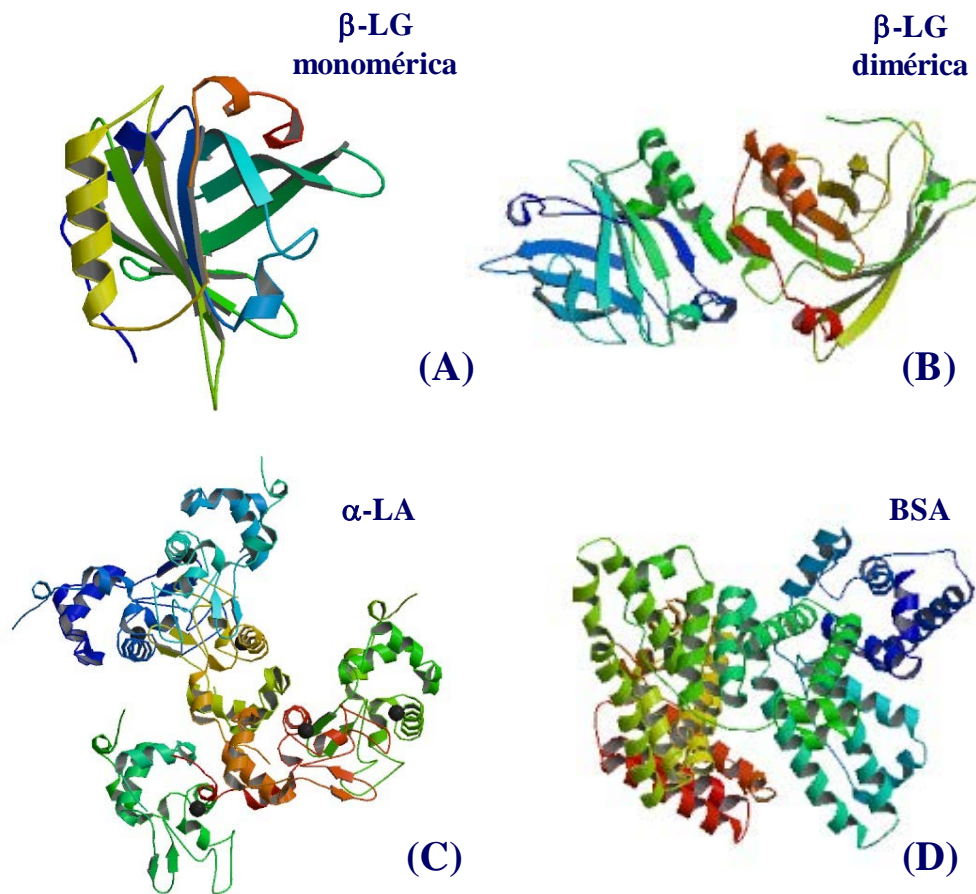


Figura 1.3. Estructura tridimensional de las principales fracciones de proteínas del suero lácteo.

(A) β -LG monomérica, (B) β -LG-dimérica, (C) α -LA y (D) BSA.

La β -LG es la proteína que se encuentra en mayor proporción, constituyendo aproximadamente el 60% del total de las proteínas del suero (correspondiendo a una concentración de 2,0 a 4,0 g/L), razón por la cual es un producto con gran potencial para la formulación de alimentos. Se presenta en siete variantes genéticas: A, B, C, D, E, F y G (Fox, 2003). Tanto la variante genética A como B se producen con alta frecuencia en la mayoría de las razas bovinas afectando notablemente las propiedades fisicoquímicas

de la leche (Jakob y Puhán, 1992; Hill y col., 1996). Sin embargo, la proteína de referencia para esta familia es la β -LG B (Farrel y col., 2006). Su secuencia consiste en una cadena de 162 aminoácidos con un peso molecular de 18 KDa (Léonil y col., 1995, Burr y col., 1997). Posee cinco residuos de Cys, cuatro de ellos participan en dos uniones disulfuro intramoleculares uniendo los residuos Cys₆₆-Cys₁₆₀ y Cys₁₀₆-Cys₁₁₉, y el quinto residuo, Cys₁₂₁ se considera una fuente de -SH libre (Papiz y col., 1986; Bewley y col., 1997; Brittan y col., 1997; Brownlow y col., 1997; Qin y col., 1999). La existencia de este grupo -SH libre puede promover la polimerización de las proteínas vía formación de puentes disulfuro intermoleculares durante tratamientos térmicos a elevadas temperaturas (de la Fuente y col., 2002).

La estructura secundaria de β -LG consiste de un 15% de α -hélice, estabilizada por interacciones hidrofóbicas entre residuos no polares y Lys, un 50% de lámina β y un 15-20% de ordenamiento al azar (Qin y col., 1999). En cuanto a su estructura cuaternaria, se sabe que la β -LG se encuentra en forma de dímero a un valor de pH entre 5 y 7 vía formación de puentes de hidrógeno (Pérez y Calvo, 1995). La estructura tipo lámina- β antiparalela se asocia con otra igual de otra molécula de proteína formando doce uniones hidrógeno en la superficie del dímero (Brownlow y col., 1997). A valores de pH inferiores a 3,5 o superiores a 7,5 se lleva a cabo la disociación de los dímeros, debido a repulsiones electrostáticas, mientras que a valores de pH entre 3,5-5,2 la β -LG se encuentra en la forma de tetrámeros y octámeros (Pérez y Calvo, 1995). Posee un bajo contenido en Pro y alto contenido en Cys y Met hacen que β -LG sea inestable frente a agentes desnaturizantes, como el calor, los álcalis, los compuestos orgánicos y metales pesados (Walzem y col., 2002; Cheftel y col., 1989).

La β -LG tiene capacidad de fijar minerales, ya que posee regiones con una gran cantidad de aminoácidos cargados. Además, posee una cavidad hidrofóbica central (calix) que interviene en la incorporación de agentes bioactivos liposolubles, como vitaminas (A y D) y ácidos grasos esenciales, entre otros compuestos (Hambling y col., 1992; Pérez y Calvo, 1995; Narayan y Berliner, 1997; Sawyer, 2003 Qin y col., 1999). Se considera que esta propiedad tiene que ver con la función biológica de la β -LG al igual que todos los miembros de su familia, las proteínas lipocalinas (Cho y col., 1994).

Por otro lado, la α -LA es la segunda proteína que se encuentra en mayor proporción en el suero lacteo representando cerca del 20% del total, lo que corresponde a una concentración de 1,0 a 1,7 g/L (Jenness, 1974). Se expresa en la glándula mamaria donde desempeña una importante función fisiológica en la síntesis de lactosa (Brew y Hill, 1975; Kuhn y col., 1980). Esta constituida por 123 aminoácidos (Brew y col., 1970) y cuatro enlaces disulfuro localizados entre los residuos Cys₆-Cys₁₂₀, Cys₂₈-Cys₁₁₁, Cys₁-Cys₇₇ y Cys₇₃-Cys₉₁. Presenta tres variantes genéticas A, B y C, siendo la variante B la más común en leche bovina (Farrel y col. 2006), posee un peso molecular 14,4 KDa y un elevado contenido de residuos de Trp (~7,2%).

La estructura primaria de la α -LA es homóloga a la lisozima de muchas especies de mamífero. La α -LA es una metaloproteína que liga iones Ca²⁺ y otros iones, en un espacio comprendido entre cuatro residuos Asp altamente conservados (Hiraoka y col., 1980, Permyakov y Berliner, 2000). Aunque es susceptible a la desnaturalización térmica, su alto grado de renaturalización es responsable de su elevada resistencia al calor (de la Fuente y col., 2002).

Por último, la BSA representa cerca de 1,5% del total de proteínas de la leche y constituye aproximadamente el 6% del total de las proteínas del suero (correspondiente

a una concentración de 0,1 a 0,5 g/L). Consiste en una cadena de 582 aminoácidos, de peso molecular aproximado de 66,2 KDa (Brown, 1975; Reed y col., 1980). Su estructura globular está estabilizada por 17 puentes disulfuro intramoleculares y además posee un grupo -SH libre. Se puede encontrar como monómero o dímero. Posee baja estabilidad térmica, por lo que se desnaturaliza fácilmente. A nivel fisiológico, ejerce una importante función en el transporte, metabolismo y distribución de ligandos lipofílicos (Carter y Ho, 1994).

1.4.1.3. Obtención industrial de proteínas de suero lácteo

Los procedimientos de obtención industrial de proteínas de suero lácteo se basan en el diferente comportamiento fisicoquímico que presentan estas proteínas bajo condiciones definidas. De esta manera, el método de obtención empleado determina las diferencias en composición, las características fisicoquímicas y la funcionalidad de las preparaciones industriales de proteínas de suero lácteo (McDonough y col., 1974; Morr, y Ha, 1993; de Wit y col., 1986; Morr y Foegeding, 1990; Huffman y Harper, 1999).

Los productos en polvo a base de proteínas del suero que se comercializan comúnmente son concentrados (WPC) y aislados (WPI). Las preparaciones de WPC tienen porcentajes de proteína que varían entre 30-85%, mientras que los WPI poseen contenidos de proteína mayores al 90%. El proceso de obtención de WPI involucra etapas adicionales e implica costos más elevados, por esta razón los WPI tienden a ser utilizados en aplicaciones más específicas que los WPC (de Wit y col., 1986; Morr y Foegeding, 1990).

La industria láctea argentina se dedica a la obtención de proteínas del suero, ya sea utilizando la capacidad de las plantas productoras de leche en polvo o empleando plantas exclusivamente diseñadas para la producción de las mismas.

Desde 1970 aproximadamente, la ultrafiltración (UF) es el proceso más utilizado para la obtención de WPC. El proceso de UF consiste en la separación fisicoquímica de un permeado compuesto por moléculas pequeñas (lactosa, sales y agua) de un retenido mayormente compuesto por proteínas del suero. La UF se caracteriza por poseer un espectro de corte que va de 3 a 100 KDa. El corte más común para sistemas de lechería es 10 KDa. Sin embargo, el límite superior de fraccionamiento es determinado por el diseño de la planta.

La Figura 1.4 muestra un diagrama de flujo para la obtención de WPC por UF. Por lo general, el suero de leche es filtrado o centrifugado para remover partículas suspendidas de queso. Eventualmente, se emplean distintos procedimientos de pre-tratamiento diseñados para mejorar el rendimiento de la planta de UF y/o para modificar las características del WPC, resultando en productos de bajo contenido en grasas o con algunas propiedades funcionales mejoradas. Los pre-tratamientos incluyen: ajustes de temperatura, pH y adición de Ca^{2+} (Matthews y Doughty., 1978; Matthews, 1979), agentes secuestrantes (Hayes y col., 1974), filtración o centrifugación (Malaspina y col. 1975), clarificación y remoción de materia grasa (Madrid, 1979; Marshall, 1979). Luego de la UF, el retenido es enfriado a 4 °C y almacenado hasta acumular un volumen adecuado. El retenido también puede pasteurizarse por medio de un proceso HTST (alta temperatura-corto tiempo) debido a que bacterias y esporos pueden acumularse durante la UF.

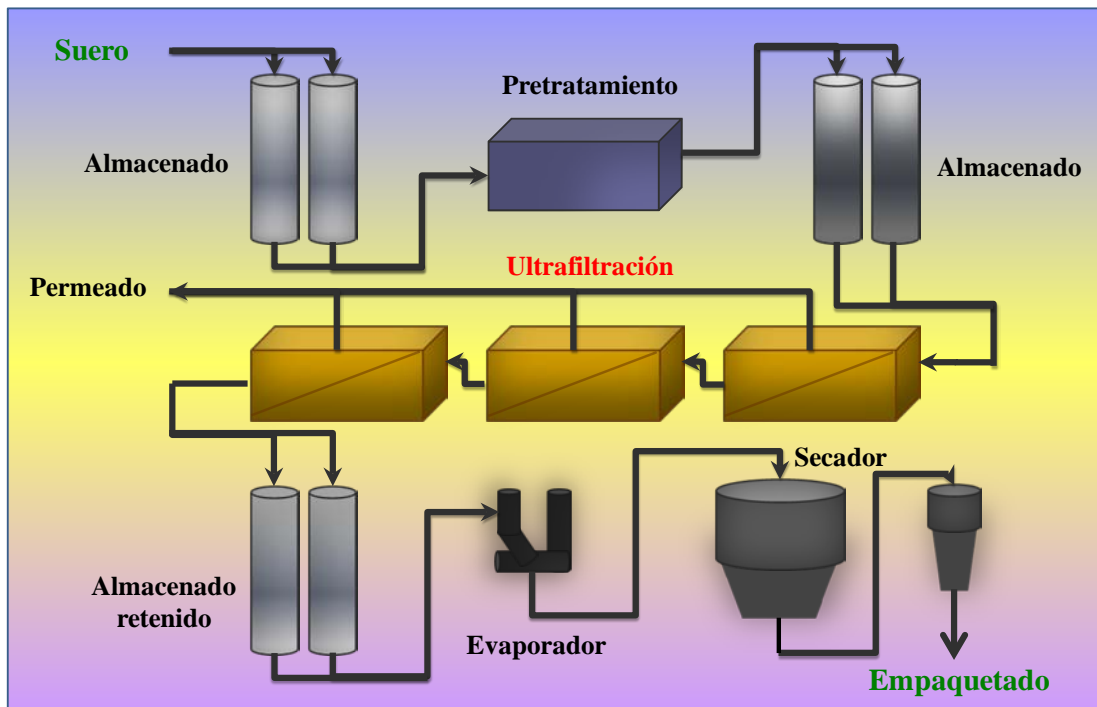


Figura 1.4. Representación esquemática del proceso de obtención industrial de WPC.

Por otro lado, la producción industrial de WPI hace uso de la propiedad anfótera de las proteínas de suero lácteo. La obtención requiere el ajuste del suero a pH <4,6 y la aplicación de un proceso de intercambio catiónico. Bajo estas condiciones, las proteínas son adsorbidas por resinas de intercambio iónico mientras que la lactosa, la grasa y otros compuestos son eluidos. Posteriormente, la resina es resuspendida en agua y el pH es ajustado a pH 9 con hidróxido de amonio con el fin de liberar las proteínas adsorbidas. La solución de proteínas es separada de la resina por filtración. Los siguientes pasos de obtención incluyen: UF, evaporación y secado spray. Finalmente, el producto obtenido es un WPI con ~90-95% de proteína.

Tanto WPC como WPI son considerados productos GRAS (sustancias generalmente reconocidas como seguras, por sus siglas del inglés “generally recognized as safe”) por el Departamento de Administración de Alimentos de Estados Unidos

(USFDA), y presentan un amplio rango de aplicaciones debido a su variada funcionalidad.

1.4.1.4. Aplicaciones y funcionalidad

Desde un punto de vista nutricional y tecnológico, las proteínas del suero lácteo en sus formas de concentrados proteicos (WPC) y aislados (WPI), brindan la posibilidad de satisfacer el requerimiento creciente por parte de la industria de nuevos ingredientes funcionales que puedan ser utilizados en reemplazo parcial de la leche, en productos dietéticos, de contenido graso reducido, sin colesterol o sencillamente como emulsionante, agente de batido o gelificante (Morr y Ha, 1993). En la actualidad se aplican a alimentos lácteos (helados, yogures, productos untables y de bajas calorías), productos cárnicos (carnes procesadas, embutidos), panificados (bases para pasteles, galletitas, barras nutritivas), confitería (chocolates, coberturas, caramelos) y bebidas (mezclas con cacao, crema para café, bebidas para deportistas).

Por otro lado, las propiedades funcionales de proteínas se refieren a aquellas propiedades físicas y químicas que afectan el comportamiento de las mismas en sistemas alimentarios durante el procesamiento, el almacenamiento, preparación y consumo (Cheftel y col., 1989; Phillips, 1994). La comprensión de las propiedades físicas, químicas y funcionales de las proteínas y de los cambios en estas propiedades generados durante el procesamiento constituye un aspecto clave para la interpretación del comportamiento de las proteínas en los alimentos (Damodaran, 1996b).

Las propiedades funcionales de las proteínas del suero lácteo incluyen la gelificación, retención de agua, solubilidad, emulsificación, espumado, espesamiento y

absorción y/o retención de lípidos y flavours (de Wit y col., 1988; Ennis y Mulvihill, 2000). Estas propiedades están relacionadas con sus características físicas, químicas y estructurales intrínsecas, incluyendo tamaño, forma, composición y secuencia de aminoácidos, carga neta, distribución de cargas y relación entre hidrofobicidad e hidrofiliidad (Morr y Ha, 1993; Bryant y col., 1998; Damodaran, 1996). Además, las propiedades funcionales de estas proteínas se hallan influenciadas por la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas, las uniones intra e intermoleculares, la rigidez/flexibilidad molecular en respuesta a los cambios de las condiciones del medio acuoso y/o por la naturaleza de las interacciones con otros componentes de la matriz alimenticia.

Las proteínas del suero en su estado nativo son solubles dentro del rango de pH comúnmente utilizado en la elaboración de alimentos (3,5 a 7,0). No obstante, su solubilidad puede decrecer a medida que la concentración de sal aumenta debido al fenómeno de *salting out*. Además, dichas proteínas pierden solubilidad cuando son sometidas a tratamientos térmicos por encima de los 70 °C debido al fenómeno de desnaturalización y/o agregación. En este caso, el grado de insolubilización dependerá de la temperatura, tiempo, pH y concentración de minerales (especialmente Ca^{2+}) presentes en las suspensiones durante el calentamiento. Aunque las proteínas de suero lácteo, en general, presentan una importante cantidad de residuos hidrofóbicos, son muy solubles en agua ya que la mayoría de los residuos no polares están ocultos en cavidades internas y la mayoría de los grupos polares están expuestos en la superficie (Mangino, 1987; Iametti y col., 1990).

A elevadas concentraciones, las proteínas del suero lácteo incrementan la viscosidad de sus disoluciones. La viscosidad de las suspensiones de proteínas del suero

en estado nativo decrece a temperaturas entre los 30 y 65 °C, presentando un valor mínimo alrededor de su punto isoeléctrico (pI). Sin embargo, la viscosidad de estas suspensiones se incrementa notablemente a temperaturas superiores a los 70 °C debido a la desnaturalización y/o agregación de las proteínas.

Además, relacionado con su alta solubilidad en agua, las proteínas del suero lácteo son muy activas superficialmente, lo que le proporciona buenas propiedades superficiales e interfaciales. Sin embargo, las propiedades superficiales dependen mucho del estado de desnaturalización que presentan; por lo tanto, estas propiedades se verán modificadas por las condiciones del medio como el pH, fuerza iónica, etc. (Cayot y Lorient, 1996).

1.4.1.5. Propiedades interfaciales

Las proteínas del suero lácteo muestran una fuerte tendencia a adsorberse sobre interfases fluidas (aire-agua y aceite-agua) y es por ello que se distinguen por sus buenas propiedades espumantes y emulsificantes (Mellema y Isenbart, 2004; Dickinson, 2001; Carrera y Rodríguez Patino, 2005). Frecuentemente, esta propiedad es influenciada por factores tales como la concentración de proteína, el grado de desnaturalización y/o agregación, pH y fuerza iónica.

En términos generales, las películas de proteínas adsorbidas sobre la interfase aire-agua (espumas) y las que se adsorben sobre la interfase aceite-agua (emulsiones) presentan numerosas analogías. No obstante, en la presente Tesis Doctoral se hará hincapié en las propiedades superficiales que manifiestan las proteínas del suero lácteo cuando son adsorbidas sobre la interfase aire-agua.

Las propiedades dinámicas superficiales de las proteínas del suero lácteo, tales como la velocidad de adsorción interfacial y características viscoelásticas de las películas interfaciales, se consideran de enorme importancia durante la formación y estabilización de espumas (Carrera y Rodríguez Patino, 2005). La formación de una espuma alimenticia está influenciada por el mecanismo de adsorción de proteínas sobre la interfase aire-agua y por su capacidad de reducir la tensión superficial (Carrera y Rodríguez Patino, 2005; Rodríguez Patino y col., 2008).

Por otro lado, la estabilización de una espuma requiere de la combinación de diferentes características mecánicas superficiales de la película adsorbida (Wilde, 2000; Dickinson, 2003). Así, el uso óptimo de proteínas del suero lácteo en la elaboración de un alimento espumado depende del conocimiento de sus características fisicoquímicas, tales como la actividad superficial, viscoelasticidad superficial (bajo condiciones dilatacionales o de cizalla) y de la dinámica de formación de la película a nivel de la interfase aire-agua. Obviamente, estas propiedades van a ser modificadas cuando en el sistema se cuente con la presencia de otros ingredientes de la matriz alimenticia, fundamentalmente, los lípidos y los polisacáridos (Cornec y Narsimhan, 1998; Baeza y col. 2005, 2006).

1.4.1.6. Mejoramiento de la funcionalidad

Una limitación para el uso de proteínas del suero lácteo en formulaciones alimenticias es su sensibilidad a las condiciones del medio acuoso, tales como pH y fuerza iónica, y a las condiciones de su obtención y procesamiento, como el tratamiento térmico, entre otras. Las variaciones en funcionalidad y composición de las proteínas de

suero lácteo industriales generalmente limitan su aplicación en la formulación de productos alimenticios estandarizados (Hurley y col., 1990; Wang y Lucey, 2003). Los procesos de elaboración de queso, los métodos separativos, los tratamientos térmicos, la extensión del secado spray y el contenido graso residual son los principales determinantes de la variación e incluso el deterioro de la funcionalidad de estas preparaciones proteicas (Hurley y col., 1990; Vaghela y Kilara, 1996; Huffman y Harper, 1999).

Por estas razones, una estrategia, objeto de estudio durante los últimos años, fue encontrar procesos y/o tratamientos que permitan el mejoramiento de las propiedades funcionales de las proteínas del suero lácteo. Las distintas estrategias se basan en la modificación química, física y enzimática de las mismas mediante una variedad de procesos que incluyen acidificación, calentamiento, hidrólisis y entrecruzamiento enzimático (Panyam y Kilara, 1996; Davis y col., 2005; Wierenga y col., 2003). Estos tratamientos mejoran la capacidad de las proteínas de formar geles, la retención de agua y las propiedades interfaciales (Dickinson, 1992; Blecker y col., 1997). Las operaciones de procesamiento tales como calentamiento, altas presiones, y mezclado con otras proteínas pueden diseñarse para controlar las interacciones proteína-proteína y así obtener determinadas texturas y microestructuras específicas. Por medio de cambios de las condiciones ambientales y de procesamiento es posible modular la extensión de los cambios estructurales de las proteínas y, por lo tanto, afectar la dinámica molecular, las cinéticas de agregación, de adsorción interfacial o de formación de sitios activos (Wierenga y col., 2003; 2006; 2009). No obstante, muchas de las modificaciones estructurales de las proteínas podrían alterar su digestibilidad y/o alergenicidad

(Matoba y col., 1980) y por este motivo no encontrarían aceptación por parte de los entes reguladores y de los consumidores.

De los tratamientos citados anteriormente, la hidrólisis enzimática constituye una estrategia conveniente para el mejoramiento de la funcionalidad de las proteínas de suero lácteo (Adler-Nissen, 1986; Exl, 2001). El tratamiento enzimático limitado con diversos tipos de proteasas mejora sustancialmente las propiedades de espumado de las proteínas del lactosuero (Chobert y col., 1988a; van der Ven y col., 2001). Sin embargo, las relaciones entre las propiedades fisicoquímicas interfaciales y las propiedades espumantes de los hidrolizados de proteínas no han sido del todo aclaradas (Ipsen y col., 2001; Miñones Conde y Rodríguez Patino, 2007; Croguennec y col. 2006).

El mejoramiento de las propiedades interfaciales es atribuido a una mayor exposición de áreas hidrofóbicas y a un aumento en la flexibilidad molecular de los hidrolizados, características que incrementan su afinidad por la interfase aire-agua y su velocidad de adsorción (Bernardi y col., 1991; Bombara y col., 1997; Chobert y col., 1988b; Vioque y col., 2000). No obstante, si bien la hidrólisis enzimática mejora la formación de espumas, por otro lado, repercute negativamente sobre la estabilidad de estos sistemas dispersos, sobre todo a elevados grados de hidrólisis (Vioque y col., 2000; Ye y col., 2004; Martinez y col, 2005).

Por otro lado, la estrategia más sencilla para mejorar la funcionalidad tanto de las proteínas del lactosuero como la de sus hidrolizados es a través de la interacción con polisacáridos. En la formulación de bebidas y productos lácteos aireados, por ejemplo, se incluyen distintos polisacáridos aniónicos (alginatos, carrageninas, goma xántica, pectinas, etc.) con el fin de prolongar su estabilidad y contribuir a las características texturales mediante interacción con proteínas (Sharma, 1981; Schmidt y Smith, 1992;

Syrbe y col., 1998; Mishra y col., 2001, Dickinson, 2003). De esta manera, el uso de polisacáridos podría balancear e incluso promover la funcionalidad de las mismas a través de diferentes interacciones macromoleculares entre estos biopolímeros (Dickinson, 2003, Tolstoguzov, 1986, 2003).

1.4.2. Polisacáridos

1.4.2.1. Características generales

Durante los últimos 50 años, el mercado de los polisacáridos de uso alimentario ha sido dominado por cinco grandes grupos que incluyen: pectinas, galactomananos, goma arábiga, alginatos y carrageninas.

Los polisacáridos de origen vegetal, incluyendo los que se extraen de algas marinas, generalmente son considerados como fibra dietética resistente a la degradación digestiva debido a que el intestino humano carece de las enzimas necesarias para romper sus enlaces. Algunos polisacáridos son susceptibles a la degradación mediada por microorganismos intestinales que utilizan los monosacáridos libres como fuente de energía para su metabolismo. Sin embargo, la contribución relativa de estas fuentes a la nutrición humana es un tema de actual debate (Leiria Campo y col., 2009).

Los polisacáridos o gomas alimenticias pueden definirse en términos prácticos como moléculas de alto peso molecular con características predominantemente hidrofílicas y con capacidad de aumentar la viscosidad y/o producir geles al dispersarse en agua (Whistler y Daniel, 1985; Whistler, 1973).

Los polisacáridos se han descrito en la bibliografía de muchas maneras diferentes y a menudo se clasifican según su origen y/o composición química. La composición y el tamaño molecular de los polisacáridos dependen fundamentalmente del genotipo de su fuente de extracción y de las condiciones ambientales de cultivo.

Por lo general, los polisacáridos se describen en términos de sus componentes monosacáridos principales y por las sustituciones que puede presentar la estructura monomérica. Las cadenas de polisacáridos pueden ser lineales o ramificadas. Según las características de las cadenas, longitud, ramificaciones, grupos funcionales cargados o hidrofóbicos, los polisacáridos pueden ser solubles en frío, o bien pueden necesitar un tratamiento térmico previo para facilitar la dispersión (Sand, 1982, Sanderson, 1986).

Las propiedades funcionales de los polisacáridos dependen en gran medida de la conformación que pueden adoptar en solución (hélice o estructurados al azar), lo que a su vez depende de su composición, del tipo y número de grupos sustituidos. La dinámica molecular de los polisacáridos en solución está gobernada por la formación de enlaces puente hidrógeno.

La propiedad más explotada de los polisacáridos es su capacidad para modificar la reología de sistemas acuosos a bajos niveles de concentración. Dependiendo de la concentración y del régimen aplicado de velocidades de corte, las dispersiones de polisacáridos pueden ser pseudoplásticas o newtonianas. La viscosidad de las dispersiones de polisacárido también puede depender del pH del medio acuoso, de la longitud de cadena y, en general, de la clase de polisacárido.

La mayoría de los polisacáridos provienen del reino vegetal (algas, semillas, exudados, frutos, cereales, tubérculos) y se obtienen por diversos procedimientos físicoquímicos bajo la forma de fracciones, cuya pureza depende del método de

extracción empleado (Dziezak, 1991). Posteriormente, algunos de estos polisacáridos son modificados químicamente con el fin de variar y/o mejorar sus aptitudes tecnológicas. Otro grupo de polisacáridos (no menos importantes) se obtienen por métodos biotecnológicos, i.e., a partir del cultivo en bioreactores de ciertas especies de microorganismos que secretan polisacáridos en forma de mucílagos bajo condiciones controladas (Sanderson, 1986; Glicksman, 1983).

Las algas marinas constituyen una excelente fuente de polisacáridos. Estos organismos sintetizan polisacáridos y mucílagos como fuente de energía para el desarrollo y mantención de su metabolismo en el medio marino. Estos polisacáridos se localizan en la pared celular de algas donde a su vez ejercen importantes funciones de protección contra los esfuerzos físicos del movimiento de las olas y de mantenimiento de la homeostasis celular frente a la desecación en bajamar y al elevado contenido de sal del mar.

1.4.2.2. Alginatos

Los alginatos se encuentran presentes en las paredes celulares de algas marrones o pardas del género *Phaeophyta*. Estas algas crecen en los océanos de todo el mundo. Sin embargo, los recursos comerciales principales de este género se encuentran en las costas de las regiones templadas de ambos hemisferios.

Las especies de importancia comercial son seleccionadas en términos del rendimiento de extracción de alginato y por la facilidad de crecimiento y recolección. Los recursos comerciales más importantes incluyen las especies: *Laminaria digitata* y *L. hyerborea* del norte de Europa y Asia, y *Macrocystis pyrifera* de la costa del

Pacífico de América del Norte. Otras especies explotadas del norte de Europa y América son *Ascophyllum nodosum* y *Fucus serratus* (Dziezak, 1991; Piriz, 1993).

La extracción de alginatos se inicia con el lavado de las algas con ácido para eliminar las impurezas y para convertirlos en su forma ácida. El alginato puede ser extraído con álcali para dar sales, que pueden ser separadas de otros materiales por filtración antes de la precipitación con ácido. El alginato puede neutralizarse con diferentes bases para dar lugar a una gran diversidad de sales solubles muy utilizadas en la industria alimentaria, principalmente sales de sodio, potasio y amonio.

Los alginatos son polímeros lineales del ácido β -D-manurónico (M) y del ácido α -L-gulurónico (G) unidos entre sí por enlace α (1-4) glucosídico (Figura 1.5). Los residuos de M y G pueden encontrarse alternados a lo largo de la cadena (regiones G-M o M-G), pero comúnmente se asocian en estructuras de copolímeros en bloques de regiones que contienen sólo G (G-G) y regiones con sólo M (M-M) (Dziezak, 1991).

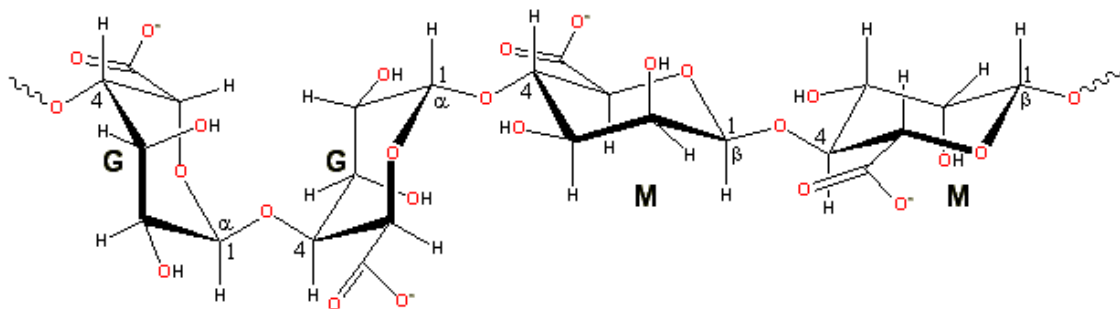


Figura 1.5. Estructura química del alginato de sodio (AS).

En solución acuosa, los alginatos pueden actuar como espesantes eficaces para aumentar la viscosidad a bajas concentraciones. Las sales de alginato son fácilmente solubles en agua fría. La viscosidad disminuye al aumentar la temperatura y,

generalmente, muestra un comportamiento pseudoplástico. Las dispersiones son inestables a pH ácido, ya que por debajo de pH 4 el alginato es insoluble formando un precipitado o gel ácido. En presencia de iones Ca^{2+} , los alginatos pueden formar un gel termoestable mediante la unión del catión entre dos bloques opuestos de G. Los bloques opuestos proporcionan un hueco o bolsillo con carga negativa que puede acomodar un ion Ca^{2+} . Esta propiedad, consecuencia de la geometría macromolecular, constituye el modelo conocido como caja de huevo o “egg-box” que fue propuesto por Grant y col. (1973) en el intento de explicar las propiedades gelificantes de alginatos en presencia de iones Ca^{2+} .

Los alginatos son comúnmente usados como espesantes, estabilizantes y agentes gelificantes. Se aplican en la fabricación de películas comestibles, helados, productos lácteos (bebidas y yogures), salsas y son un ingrediente importante en la elaboración de cervezas (Dziezak, 1991; Imeson, 1990; Sanderson, 1986).

1.4.2.3. Carrageninas

Las carrageninas se obtienen a partir de algas rojas del género *Rhodophyta* que crecen en diferentes regiones costeras.

Las fuentes originales de carragenina son *Chondrus crispus* y *Gigartina stellata* que crecen en aguas del norte europeo. Otras especies de *Gigartina* también son explotadas en las costas de América del Sur y del Norte de África. (Dziezak, 1991; Piriz, 1993). Se obtienen por extracción en agua caliente, seguida por la precipitación con etanol, secado y molienda.

Estos polisacáridos constituyen una familia de polímeros sulfatados que poseen una cadena lineal de D-galactosa unida de manera alternada por enlaces α (1-3) y β (1-4) glucosídicos. Los grupos sulfato pueden sustituirse en el C-2, 4 o 6 (BeMiller y Whistler, 1996; Dziezak, 1991).

Una característica estructural importante de las carrageninas es que algunos de los residuos de galactosa pueden convertirse en 3,6-anhidrogalactosa vía formación de un enlace puente entre el C-3 y C-6. Esta transformación puede ocurrir *in vivo* luego de la síntesis de la cadena o puede ser promovida durante la extracción, debido al empleo de condiciones alcalinas que den lugar a la pérdida de algunos grupos sulfatos.

La presencia de residuos de 3,6-anhidrogalactosa favorece la formación de una estructura tipo hélice. Las hélices pueden entrelazarse para formar una doble hélice que determina la formación de geles de carragenina. El aumento del contenido de grupos sulfato evita la formación de la hélice probablemente debido al incremento de la repulsión electrostática entre distintos segmentos de la cadena de carragenina.

Dependiendo del grado de sulfatación, de las posiciones de los grupos sulfato y de la presencia de residuos 3,6-anhidrogalactosa se distinguen varios tipos de carragenina, con propiedades claramente distintas. Las fracciones más importantes son:

(i) κ -Carragenina (κ -C), su cadena contiene unidades alternas de galactosa sustituida con un grupo sulfato en C-4 y residuos 3,6-anhidrogalactosa no sulfatados por lo que puede estructurarse en doble hélices que participan en la formación de geles fuertes. Sin embargo, el aumento de la temperatura favorece la separación de las cadenas y, consecuentemente, provoca la disrupción del gel de κ -C (termorreversible). La estabilidad de los geles de κ -C está influenciada por la presencia de cationes, especialmente K^+ . Los iones K^+ actúan como contraiones reduciendo la repulsión de

cargas dentro de las hélices cerca de los grupos sulfato permitiendo un empaquetamiento de las hélices más estrecho lo que fortalece la estabilidad del gel. Los iones Ca^{2+} ejercen un efecto similar posiblemente actuando como un agente de entrecruzamiento entre dos grupos sulfato.

(ii) ι -Carragenina (ι -C), su cadena contiene unidades alternas de galactosa sustituida con un grupo sulfato en C-4 y residuos de 3,6-anhidrogalactosa sulfatada en C-2 lo que favorece la formación de geles elásticos. Los iones K^+ no tienen efecto sobre la gelificación, pero los iones Ca^{2+} aumentan la fuerza de los gel de ι -C.

(iii) λ -Carragenina (λ -C), su cadena contiene unidades alternas de galactosa sustituida con un grupo sulfato en C-2 y residuos 3,6-anhidrogalactosa sustituida con dos grupos sulfato, uno en C-2 y otro en C-6. Debido a estas características no forma geles y no se ve afectada por la presencia de iones en el medio acuoso (Figura 1.6).

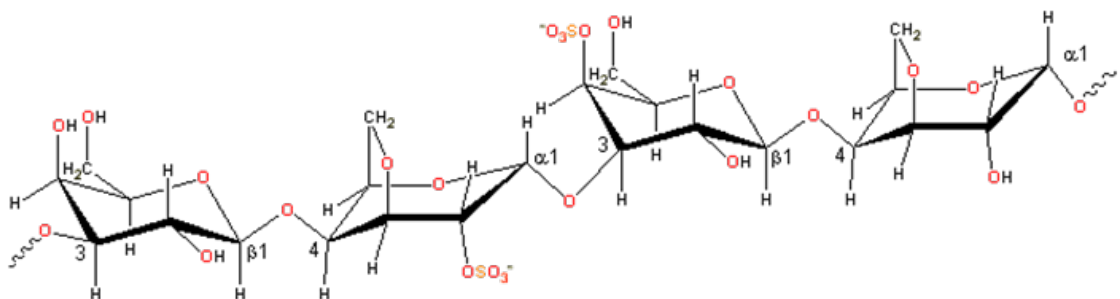


Figura 1.6. Estructura química de lambda-carragenina (λ -C).

La solubilidad de las carrageninas se relaciona con su capacidad de formación de geles y contenido de grupos sulfato. La κ -C es soluble en agua caliente ($\sim 70^\circ\text{C}$) debido a que posee una fuerte tendencia a formar geles. La ι -C debido a que posee apenas un mayor grado de sulfatación puede disolverse más fácilmente en agua tibia ($\sim 50^\circ\text{C}$), y la λ -C debido a que posee el mayor grado de sulfatación se puede disolver en agua fría.

Las carrageninas forman dispersiones altamente viscosas. La viscosidad es estable en un amplio rango de valores de pH debido a que la mayoría de los grupos sulfatos están cargados negativamente, aún bajo fuertes condiciones acídicas (BeMiller y Whistler, 1996). Las dispersiones de ι -C poseen propiedades tixotrópicas y es utilizada como componente de salsas y revestimientos. La λ -C se utiliza principalmente como espesante no gelificante. Las tres variantes de carragenina pueden mezclarse fácilmente en proporciones variables para alcanzar una reología deseada.

Las carrageninas encuentran aplicaciones en la elaboración de un gran número de productos alimenticios. Se usan como gelificantes, espesantes y estabilizantes. Históricamente, la aplicación más importante de las carrageninas (0,01-0,03 %p/p) ha sido en la formulación de productos lácteos debido a su capacidad de interacción con micelas de CN. La interacción es de tipo electrostática, entre las cargas negativas de la carragenina y las cargas positivas de la superficie de las micelas de CN. Esta asociación incrementa la resistencia de los geles, de tal forma que se pueden obtener postres lácteos de consistencia semisólida. También se comportan muy bien en productos cárnicos procesados y reestructurados, y en postres de tipo gelatina, mermeladas de frutas, etc.

1.5. INTERACCIONES ENTRE INGREDIENTES BIOPOLIMERICOS

Las interacciones entre proteínas y polisacáridos juegan un rol muy importante en la estructura y estabilidad de muchos alimentos procesados. Las propiedades funcionales de las proteínas, tales como solubilidad, actividad superficial, estabilidad conformacional, propiedades gelificantes, espumantes y emulsificantes se ven afectadas por su interacción con polisacáridos (Dickinson, 2003; McClements, 2006).

La formación, estabilidad y las propiedades mecánicas de las espumas alimenticias dependen de la forma en la que sus ingredientes interactúan entre sí, en el entorno de la interfase aire-agua y en el seno de la subfase acuosa (Hartel y Hasenhuette, 1997). Estas interacciones moleculares pueden producir cambios en las propiedades de los alimentos espumados, lo que puede repercutir sobre la textura y sobre la formación y estabilidad o incluso, sobre la inestabilidad del producto (Rodríguez Patino y col., 2003).

Las interacciones proteína-polisacárido son particularmente sensibles a las características estructurales de las macromoléculas involucradas y a las condiciones que modulan las fuerzas intermoleculares tales como el pH, composición iónica y temperatura (Galazka y col., 1999; Dickinson, 2003; Ganzevles y col., 2006).

Recientemente, se han determinado las características fisicoquímicas de sistemas proteína de suero lácteo-polisacárido en estudios modelo con el objeto de ser relacionadas con las propiedades de espumado (Weinbreck y col., 2003; Baeza y col., 2005; Ganzevles y col., 2006). En general, estas características dependen de la naturaleza de las interacciones entre los biopolímeros tanto en el seno de solución acuosa (atracción o segregación) como en el entorno de la interfase aire-agua, de la estructura química y de la concentración relativa de los componentes en el sistema. Estos estudios también revelan como la interacción macromolecular entre proteínas y polisacáridos, influenciada por las condiciones del medio acuoso (pH, fuerza iónica, etc.), puede utilizarse para manipular el comportamiento de adsorción y reológico superficial de estos biopolímeros a nivel de interfases fluidas (Baeza y col., 2005; 2006).

En respuesta a condiciones del medio acuoso tales como pH, fuerza iónica y

concentración relativa de ambos biopolímeros (Dickinson, 2003; McClements, 2006), se han descrito cuatro comportamientos para la interacción macromolecular entre proteínas de suero lácteo y polisacáridos aniónicos en el seno de solución (Weinbreck y col., 2003). Estos comportamientos se resumen en la Figura 1.7 y se detallan como sigue:

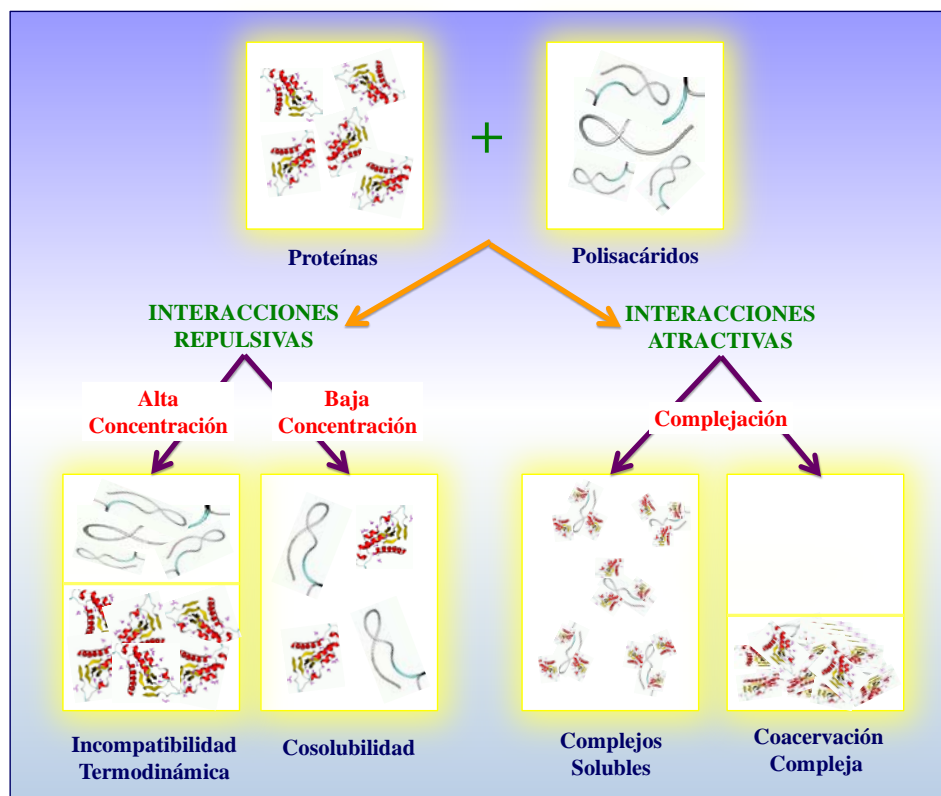


Figura 1.7. Representación esquemática de los distintos comportamientos de interacción que puede presentar un sistema mixto compuesto por proteínas de suero lácteo y polisacáridos aniónicos (adaptado de McClements, 2006).

(i) A pH neutro y baja fuerza iónica, tanto proteínas como polisacáridos tienen carga negativa ya que se encuentran en condiciones de $pH > pI$ y $pH > pK$, respectivamente. Si la concentración de biopolímeros en el sistema es elevada, generalmente, ocurre el fenómeno de separación de fases segregativa o incompatibilidad

termodinámica entre ambos tipos de biopolímeros, debido a interacciones electrostáticas repulsivas y diferentes afinidades hacia el solvente (Tolstoguzov, 2003). Sin embargo, a bajas concentraciones de biopolímeros, los componentes pueden permanecer co-solubles. En estas condiciones, también pueden existir interacciones electrostáticas atractivas entre los sitios positivos sobre la superficie de la proteína y las cargas negativas del polisacárido,

(ii) A pH cerca del punto isoeléctrico (pI) de la proteína o relativamente por debajo del mismo, las proteínas tienen carga positiva ($\text{pH} > \text{pI}$) y los polisacáridos tienen carga neta negativa ($\text{pH} > \text{pK}$), por lo tanto, se forman complejos solubles proteína-polisacárido debido a la existencia de interacciones electrostáticas atractivas.

(iii) Finalmente, la reducción del pH del medio acuoso conduce a la asociación de los complejos solubles y, consecuentemente, a la coacervación compleja. Por lo general, a pH por debajo de 2,5, la formación de complejos electrostáticos es suprimida debido a la protonación de los grupos funcionales del polisacárido.

Por otro lado, para el entorno de la interfase aire-agua se postularon tres comportamientos de interacción entre proteínas de suero lácteo y distintos polisacáridos. Los distintos comportamientos dependen de las condiciones del medio (pH, fuerza iónica) que modulan el carácter de las interacciones proteína-polisacárido en el seno de solución (atracción o segregación) y de la estructura química y actividad superficial de los polisacáridos (Baeza y col., 2005; 2006). Estos comportamientos se representan en la Figura 1.8 y se detallan a continuación:

(i) *Adsorción competitiva*. Este fenómeno ocurre cuando los biopolímeros se adsorben por su cuenta y compiten por los sitios de la interfase aire-agua. Algunos polisacáridos naturales (pectinas, goma arábiga) o sintéticos (derivados de la celulosa y

alginato) tienen la capacidad de adsorberse sobre la interfase aire-agua, por lo tanto, pueden ser capaces de coexistir con proteínas adsorbidas y/o desplazarlas de la interfase dependiendo de la magnitud de su actividad superficial.

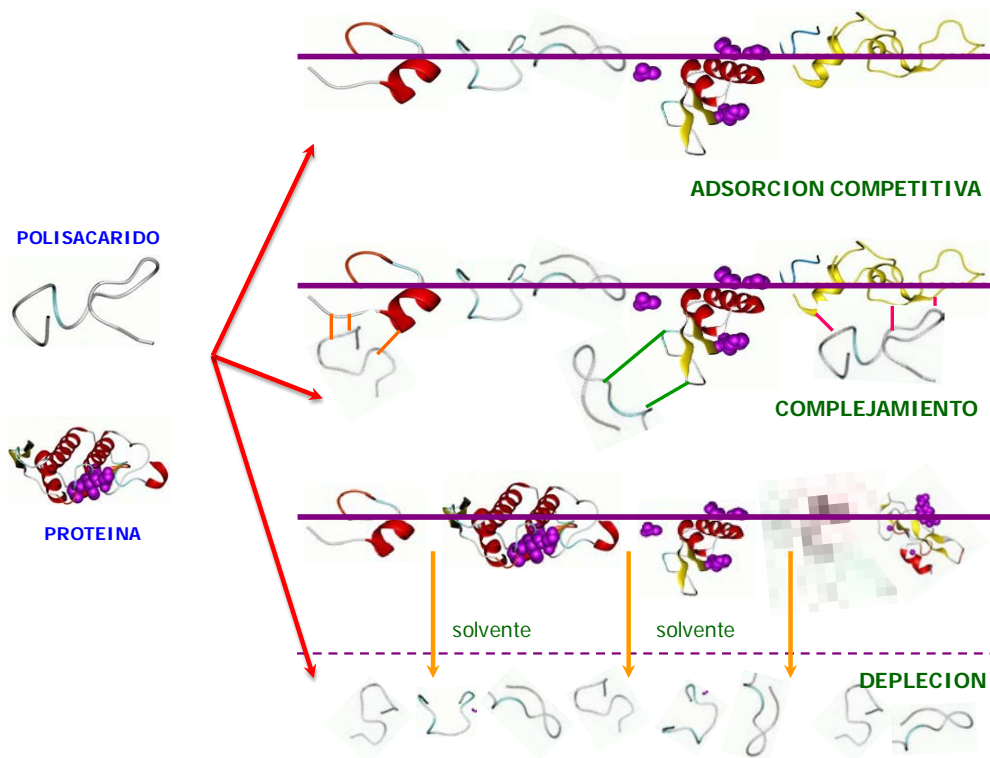


Figura 1.8. Representación esquemática de las distintas interacciones macromoleculares entre proteínas y polisacáridos en el entorno de la interfase aire-agua (Baeza y col., 2005).

(ii) *Adsorción o formación interfacial de complejos electrostáticos.* Tiene lugar cuando los biopolímeros se adsorben juntos bajo la forma de complejos o entidades macromoleculares híbridas, o bien, debido a la atracción entre la proteína adsorbida y el polisacárido en la subfase acuosa vía interacciones electrostáticas y/o de puente de hidrógeno.

(iii) *Incompatibilidad termodinámica o segregación interfacial.* Este

fenómeno ocurre en el entorno interfacial cuando la actividad termodinámica de la proteína es alterada debido a la presencia del polisacárido en la subfase acuosa. La fuerza conductora de esta interacción es de naturaleza osmótica y deriva en la segregación y concentración de la proteína adsorbida por mecanismos de depleción.

Además, en el entorno de la interfase aire-agua, la naturaleza de las interacciones proteína-polisacárido podría ser afectada por el tratamiento enzimático de la proteína, dependiendo del grado de hidrólisis de la misma y de la estructura química del polisacárido (Ye y col., 2004). En un estudio reciente, Martínez y col. (2007) demostraron que una hidrólisis limitada fue suficiente para mejorar las propiedades interfaciales de un aislado proteico de soja en combinación con polisacáridos.

En resumen, existen numerosos trabajos acerca del comportamiento interfacial de las proteínas del suero lácteo sobre la interfase aire-agua (De Feijter y Benjamins, 1987; Rodríguez Patino y col., 1999; Carrera y col., 2005) y actualmente existe un creciente interés en el estudio de la dinámica de adsorción de estas proteínas en relación a la presencia de polisacáridos en la subfase acuosa (Baeza y col., 2005, 2006; Ganzevles y col., 2006). Sin embargo, la mayoría de estos estudios fueron abordados en sistemas modelo (mezcla de biopolímeros puros) cuyo comportamiento podría ser relativamente diferente al comportamiento real de un sistema espumado alimenticio, el que contempla la existencia de un gran número de interacciones entre los componentes de las materias primas. Por esta razón, debido a la complejidad de los mecanismos que intervienen durante la formación y estabilización de espumas, en la formulación de nuevos productos alimenticios, se requieren estudios involucrando materias primas obtenidas de manera industrial y comercialmente disponibles.

Capítulo 2

OBJETIVOS

El aprovechamiento del suero procedente de la elaboración de quesos tiene una especial importancia económica para la industria láctea de nuestro país. Por este motivo, existe un gran interés en la realización de estudios que permitan ampliar los conocimientos referidos a las propiedades espumantes (entre otras propiedades funcionales) de las proteínas del suero para que puedan ser utilizadas como ingredientes funcionales en la elaboración de productos espumados y en alimentos en general. Además, el interés también se extiende a la realización de estudios dedicados a profundizar los conocimientos sobre el comportamiento fisicoquímico de alimentos espumados elaborados con estas proteínas y otros aditivos (e.g., polisacáridos). Esto se debe a que un alimento constituye una matriz compleja que tiene un comportamiento fisicoquímico propio que no está dado necesariamente por la suma del comportamiento individual de cada uno de sus ingredientes, si no por la naturaleza de las interacciones entre los mismos.

Las propiedades espumantes de las proteínas de suero lácteo derivan de su fuerte tendencia a adsorberse sobre la interfase aire-agua. Sin embargo, las variaciones en composición y funcionalidad, generalmente, limitan la aplicación de estas proteínas en la formulación de productos espumados estandarizados. Por lo tanto, las estrategias de formulación que permitan la existencia de interacciones sinérgicas entre proteínas y otros aditivos alimenticios, tales como los polisacáridos, así como también la aplicación de tecnologías adecuadas que den lugar a la modificación estructural de proteínas, tales como la hidrólisis enzimática, podrían plantearse como alternativas para ampliar la utilización de las mismas como ingredientes funcionales de productos espumados.

Por lo tanto, la presente Tesis Doctoral propone como **Objetivo general:**

“Investigar desde un punto de vista básico y aplicado el impacto de la adición de polisacáridos aniónicos y de la hidrólisis enzimática limitada sobre las propiedades espumantes de proteínas de suero lácteo industriales para reunir los conocimientos que permitan el desarrollo de ingredientes funcionales que puedan ser incorporados en productos alimenticios espumados”.

Además, se proponen como **Objetivos específicos:**

- ❖ Estudiar el efecto de la adición de polisacáridos sobre las propiedades interfaciales (cinéticas y reológicas) y espumantes de proteínas de suero lácteo.
- ❖ Estudiar el efecto de la hidrólisis enzimática limitada sobre las propiedades interfaciales (cinéticas y reológicas) y espumantes de proteínas de suero lácteo.
- ❖ Estudiar el efecto de la adición de polisacáridos sobre las propiedades interfaciales (cinéticas y reológicas) y espumantes de hidrolizados de proteínas de suero lácteo.

Capítulo 3

FUNDAMENTOS TEORICOS

3.1. BASES MOLECULARES Y TERMODINAMICAS DEL COMPORTAMIENTO DE INTERACCION ENTRE PROTEINAS Y POLISACARIDOS EN SOLUCIÓN ACUOSA

3.1.1. Comportamiento individual de biopolímeros en solución acuosa

3.1.1.1. Estructura y conformación

Las propiedades funcionales y las interacciones entre biopolímeros en los alimentos están fuertemente influenciadas por sus características moleculares, tales como su peso molecular, conformación, flexibilidad, polaridad e hidrofobicidad (Dea, 1982; Kinsella, 1982; Damodaran, 1996, BeMiller y Whittler, 1996). Estas características moleculares son determinadas por el tipo, número y secuencia de los monómeros que conforman las cadenas de biopolímeros (van Holde, 1977, MacGregor y Greenwood, 1980).

Las proteínas son polímeros de aminoácidos, mientras que los polisacáridos son polímeros de monosacáridos (MacGregor y Greenwood, 1980, Lehninger y col. 1993, Damodaran, 1996, BeMiller y Whistler, 1996). Los monómeros varían de acuerdo a su polaridad (iónicos, polares, no polares o anfifílicos), dimensiones y grupos funcionales (Lehninger y col. 1993). Si un biopolímero posee un solo tipo de monómero, se lo denomina homopolímero (e.g., almidón o celulosa), pero si posee diferentes tipos de monómeros, se lo denomina heteropolímero (e.g., goma xántica, goma arábiga o cualquier proteína de origen natural).

En los biopolímeros, los monómeros se unen mediante enlaces covalentes que permiten el movimiento o giro de la cadena polimérica (Lehninger y col. 1993). Los biopolímeros contienen un gran número de monómeros (normalmente entre 20 y 20.000), por lo que potencialmente pueden tener un gran número de configuraciones diferentes en solución acuosa. Sin embargo, cualquier biopolímero tiende a adoptar una conformación que minimiza su energía libre configuracional (van Holde, 1977; Dill 1990).

Las configuraciones que los biopolímeros tienden a adoptar en solución acuosa pueden dividirse en tres categorías: globular, de tipo bastón, o al azar. Los biopolímeros globulares poseen estructuras compactas muy rígidas, los biopolímeros de tipo bastón tienen estructuras extendidas bastante rígidas (a menudo helicoidales) y los biopolímeros estructurados al azar tienen estructuras dinámicas y flexibles. Estas conformaciones pueden cambiar si se modifican las condiciones del medio acuoso, e.g., pH, fuerza iónica, calidad del solvente o temperatura (Whitaker, 1977; Sand, 1982, Cesero, 1994).

En solución, un biopolímero puede existir como una molécula aislada, o puede estar asociada con otros tipos de macromoléculas. La conformación molecular y la asociación de los biopolímeros se rigen por un delicado equilibrio de energías de interacción y efectos de entropía (Dickinson y McClements, 1995).

El mecanismo que conduce a la asociación de cadenas polipeptídicas en estructuras proteicas tridimensionales es el punto de partida para comprender sus propiedades funcionales y sus interacciones con otras macromoléculas. En la cadena polipeptídica de la mayoría de las proteínas existen porciones que están organizadas en una estructura definida, y forman cadenas tipo hélices, láminas o curvas. Estas

porciones constituyen la estructura secundaria de las proteínas y son el resultado de interacciones entre aminoácidos específicos. Las proteínas también se caracterizan por una configuración tridimensional única que constituye la estructura terciaria. Si se asocian estructuras terciarias independientes por medio de interacciones entre varias cadenas polipeptídicas, la proteína tendrá estructura cuaternaria. Los distintos niveles de estructuración que pueden presentar las proteínas globulares se presentan en la Figura 3.1.

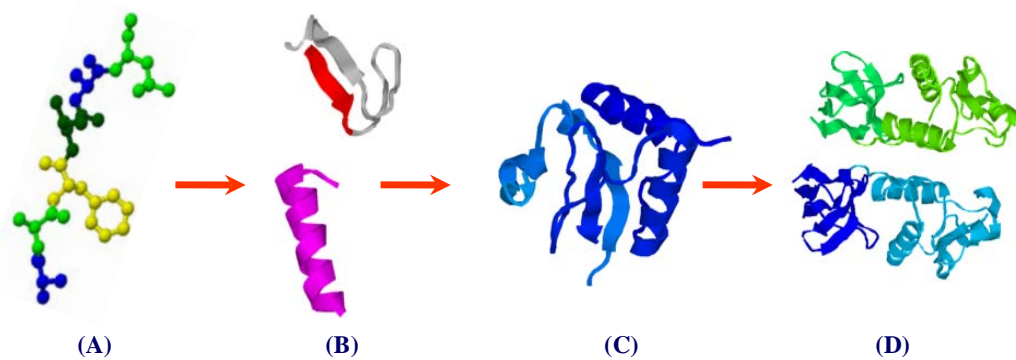


Figura 3.1. Niveles de estructuración de proteínas globulares. (A) Secuencia de aminoácidos o estructura primaria. (B) Estructura secundaria dada por la formación de hojas plegadas o láminas β y α -hélices. (C) Estructura terciaria. (D) Estructura cuaternaria.

Las proteínas en solución mantienen su conformación mediante un equilibrio de fuerzas hidrofóbicas, uniones hidrógeno, fuerzas van der Waals e interacciones electrostáticas (que pueden ser atractivas o repulsivas). Además, la estructura terciaria y cuaternaria de una proteína podría estar estabilizada por la presencia de uniones covalentes entre aminoácidos, por ejemplo, uniones por puente disulfuro (Lehninger y col. 1993). Las interacciones intramoleculares que determinan la conformación de proteínas se representan en la Figura 3.2.

La estructura de una proteína es dinámica, y el equilibrio entre las fuerzas estabilizantes de la estructura tridimensional puede cambiar a partir de modificaciones en las condiciones ambientales tales como temperatura, calidad del solvente, pH y condiciones de procesamiento. El potencial de una proteína para modificar su conformación determina sus propiedades funcionales. Durante el procesamiento o debido a cambios en las condiciones del medio acuoso, una proteína puede cambiar su conformación. Como consecuencia de estos cambios, las fuerzas que la estabilizan pueden debilitarse, permitiendo el desplegamiento o la desnaturalización proteica y exponiendo aminoácidos activos antes ocultos en el interior de la estructura proteica. Así, estos aminoácidos pueden interactuar con otros segmentos de la misma molécula o bien con segmentos presentes en otras macromoléculas vecinas.

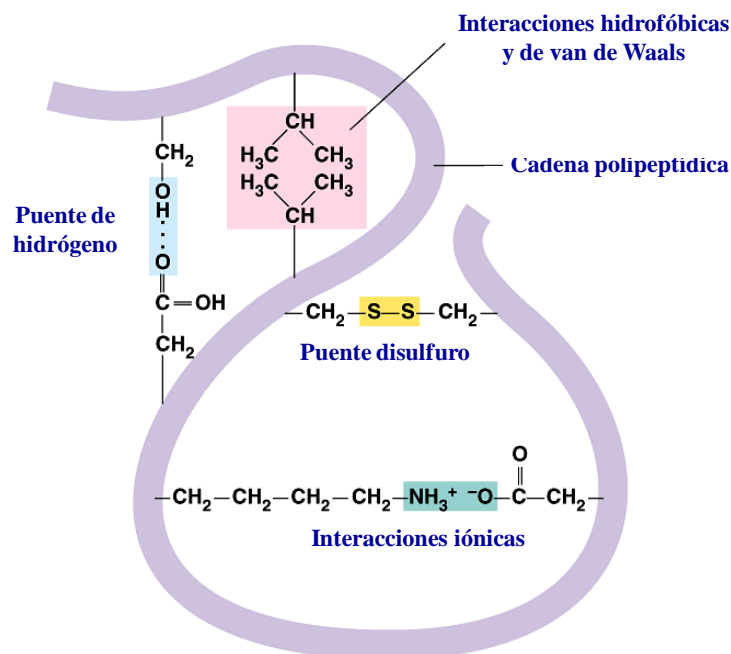


Figura 3.2. Interacciones intramoleculares que determinan la estructura conformacional de proteínas.

3.1.1.2. Interacciones hidrofóbicas

Las interacciones hidrofóbicas ejercen un rol determinante de la estructura molecular, agregación y actividad superficial de aquellos biopolímeros que poseen cantidades apreciables de residuos no polares (Alber, 1989; Dill, 1990; Damodaran, 1996). Los biopolímeros que poseen una proporción significativa de estos grupos tienden a adoptar, por efecto hidrofóbico, una conformación que reduzca al mínimo el área de contacto entre los grupos no polares y el agua. Así, un biopolímero puede reducir el área de contacto entre sus grupos hidrofóbicos y el agua al agregarse con otras moléculas no polares, o bien por adsorción sobre una superficie no polar o interfase (Figura 3.3).

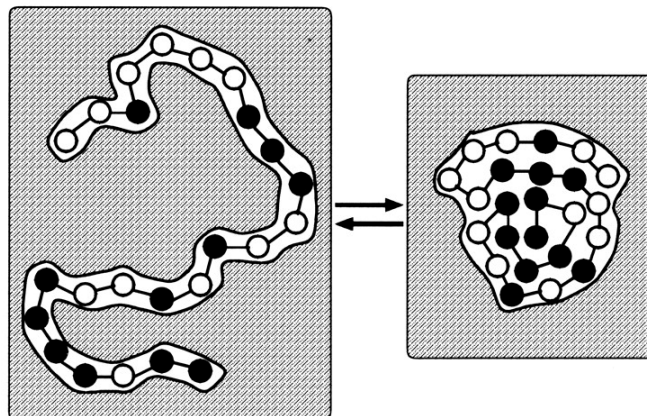


Figura 3.3. Rol de las interacciones hidrofóbicas en el equilibrio de plegamiento de proteínas. Los círculos en blanco y negro representan los residuos hidrofílicos e hidrofóbicos, respectivamente. La región sombreada representa la solución acuosa (Huang y Chandler, 2000).

Las proteínas que tienen una gran proporción de aminoácidos no polares, tales como Val, Leu, Ile y Phe (Lehninger y col. 1993), se pliegan en estructuras compactas globulares en la que dichos aminoácidos se encuentran en un dominio interior, mientras

que los residuos polares se encuentran en el exterior en contacto con el agua (Damodaran, 1996).

Las interacciones hidrofóbicas juegan un rol fundamental en las interacciones proteína-proteína y la presencia de aminoácidos no polares es considerada una característica muy importante en la determinación del potencial de una proteína como ingrediente “funcional”. La hidrofobicidad superficial se emplea como un parámetro para predecir el potencial de una proteína para asociarse bajo condiciones de calentamiento o bajo cambios de las condiciones ambientales y se relaciona con propiedades funcionales, tal como espumado y gelificación (Kato y Nakai, 1980). Debido a que una porción de los aminoácidos no polares permanece oculta en el interior de la estructura proteica, la suma de la contribución de todos los aminoácidos hidrofóbicos en la cadena polipeptídica no es una estimación fiable de la susceptibilidad de la proteína a interactuar con otras proteínas vía interacciones hidrofóbicas.

3.1.1.3. Interacciones electrostáticas

Las interacciones electrostáticas juegan un papel importante en la determinación de la estructura conformacional e interacción de biopolímeros (MacGregor y Greenwood, 1980; Dickinson y McClements, 1995; Damodaran, 1996).

Las proteínas poseen aminoácidos que se ionizan para dar lugar a grupos con carga positiva, e.g., Arg, His, Lys, Pro, y el grupo N-terminal, o grupos con carga negativa, e.g., Glu, Asp y el grupo –C-terminal (Lehninger y col. 1993; Damodaran, 1996). Algunos polisacáridos también contienen grupos ionizables en su cadena, e.g., sulfato, carboxilato, o grupos fosfato (MacGregor y Greenwood, 1980; BeMiller y

Whistler, 1996). Si un biopolímero contiene muchos grupos con las mismas cargas, es probable que adopte una configuración extendida, ya que esta característica incrementa la distancia media entre las cargas y minimiza las repulsiones electrostáticas (Launay y col. 1986; Rha y Pradipasena, 1986). Si, por el contrario, el biopolímero contiene muchos grupos con carga opuesta, es probable que se pliegue en una estructura compacta maximizando las atracciones electrostáticas. Por esta razón, las proteínas son a menudo extremadamente compactas en su punto isoeléctrico (pI) y se despliegan gradualmente cuando el pH se aleja del mismo.

Los biopolímeros que presentan similares cargas netas se repelen entre sí y, por lo tanto, tienden a existir como macromoléculas individuales. Mientras que los biopolímeros con cargas netas opuestas se atraen entre sí y, por lo tanto, tienden a asociarse dependiendo de la naturaleza y la fuerza de otros tipos de interacciones macromoleculares.

Las interacciones electrostáticas son las fuerzas principales que actúan a cierta distancia. Por ejemplo, las proteínas no sólo deben exponer sus sitios reactivos, sino también deben tener una orientación óptima para que sean capaces de interactuar con otras moléculas.

La carga neta de un biopolímero depende de los valores de pK de sus grupos ionizables y del pH del medio acuoso. Las interacciones electrostáticas entre biopolímeros son particularmente sensibles al pH de la fase acuosa (Launay y col., 1986; Rha y Pradipasena, 1986). Al cambiar el pH en una solución proteica, ocurre una redistribución de cargas en la cadena polipeptídica, los grupos ácidos tienen una carga negativa a pH neutro mientras que los grupos básicos están cargados positivamente a nivel de este pH debido a que su pK es alto. A modo de ejemplo, en la Figura 3.4 se

presenta la distribución de cargas sobre la superficie de BSA a pH neutro y baja fuerza iónica (Hattori y col., 2001).

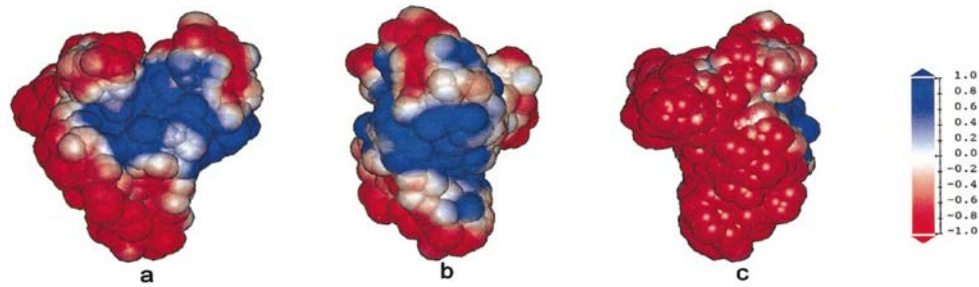


Figura 3.4. Distribución de cargas sobre la superficie de BSA a pH 7 y fuerza iónica 0,01 M calculada por Hattori y col. (2001). Las figuras (a)-(c) son representaciones de BSA en distintas direcciones. Las regiones superficiales de color rojo y azul corresponden a regiones con cargas negativas y positivas, respectivamente, y las regiones blancas son neutras.

La fuerza de las interacciones electrostáticas entre biopolímeros depende de la concentración y del tipo de contraiones presentes en solución debido a la existencia de efectos de *screening* electrostático. Los iones apantallan las cargas presentes en los biopolímeros y disminuyen las fuerzas electrostáticas totales. Sin embargo, la presencia de grupos cargados en la superficie de algunos biopolímeros puede causar una coordinación específica con ciertos iones estabilizando su estructura conformacional (Kuwajima y col., 1989).

3.1.1.4. Enlace o puente de hidrógeno

Tanto proteínas como polisacáridos poseen monómeros capaces de formar enlaces o puentes de hidrógeno (Lehninger y col. 1993). Un enlace de hidrógeno se define como

la fuerza atractiva entre un átomo electronegativo y un átomo de hidrógeno unido covalentemente a otro átomo electronegativo. Resulta de una fuerza dipolo-dipolo con un átomo de hidrógeno unido a un átomo de nitrógeno, oxígeno o de un halógeno. Los enlaces de hidrógeno son un tipo relativamente fuerte de interacción molecular y, por lo tanto, un biopolímero (e.g., una proteína) en solución tratará de maximizar el número y la fuerza de los enlaces de hidrógeno formados dando origen a la formación de regiones ordenadas como hélices y hojas plegadas (Lehninger y col. 1993). La Figura 3.5 muestra la participación de los enlaces puente de hidrógeno en la determinación de la estructura secundaria de proteínas. La formación de puentes de hidrógeno también juega un rol importante en la determinación de la estructura cuaternaria de proteínas. Por ejemplo, la asociación de monómeros de β -LG en dímeros es conducida por puentes de hidrógeno entre las estructuras lámina β de dos monómeros adyacentes (Brownlow y col., 1997).

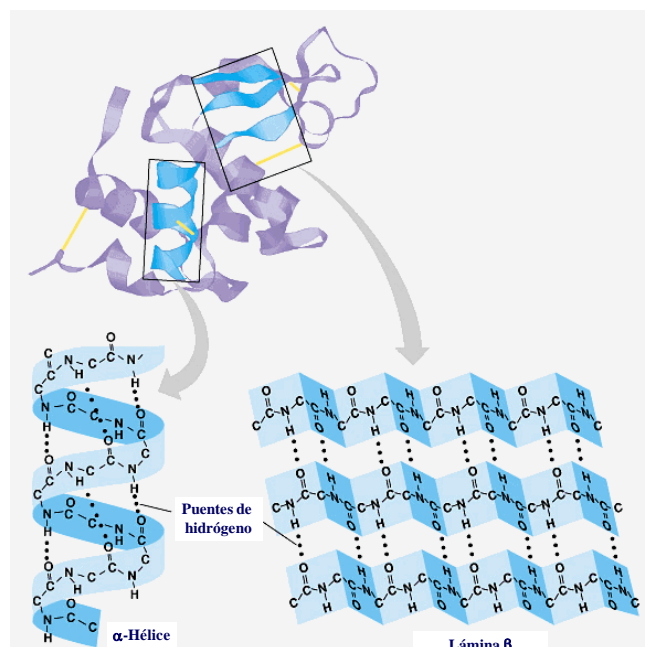


Figura 3.5. Rol de la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares en la determinación de la estructura secundaria de proteínas.

La formación de puentes de hidrógeno también es responsable de la interacción macromolecular entre distintos biopolímeros. Así, distintos segmentos de un biopolímero pueden ser capaces de formar fuertes puentes de hidrógeno con segmentos de otra macromolécula (Lehninger y col. 1993).

Por otro lado, un biopolímero puede adoptar una estructura menos ordenada con el objeto de que los monómeros formen puentes de hidrógeno con moléculas de agua circundantes. Por lo tanto, una parte o la totalidad de un biopolímero puede existir en una conformación muy ordenada (entrópicamente desfavorable) con un elevado número de puentes de hidrógeno intramoleculares, o bien puede existir en una conformación al azar (entrópicamente más favorable), con un mayor número de puentes de hidrógeno intermoleculares.

3.1.1.5. Solapamiento estérico e interacciones de van de Waals

Existe una interacción de repulsión muy fuerte entre los átomos o moléculas a distancias muy cortas debido a la superposición de nubes electrónicas. Este fenómeno se conoce como solapamiento estérico y determina la distancia mínima entre dos átomos o moléculas. La existencia de esta repulsión restringe en gran medida la distribución espacial de los monómeros de un biopolímero debido a que dos grupos no pueden ocupar el mismo espacio.

A nivel molecular, las interacciones de van der Waals operan en todos los tipos de moléculas y tienden a magnitudes muy similares (Israelachvili, 1992). Son fuerzas atractivas débiles entre dipolos transientes e inversamente proporcionales a la distancia entre moléculas. En lo que respecta a la determinación de la conformación de

biopolímeros en solución acuosa, las interacciones de van der Waals sólo desempeñan un papel menor. Sin embargo, si un biopolímero es lo suficientemente grande (del tamaño de una partícula coloidal) entonces puede existir una atracción de van der Waals significativamente fuerte, lo que favorece su interacción con otros biopolímeros.

3.1.1.6. Puentes disulfuro

La estructura conformacional y el comportamiento de agregación de muchas proteínas son afectados por su capacidad para formar puentes disulfuro (MacGregor y Greenwood, 1980; Dickinson y McClements, 1995; Damodaran, 1996).

La Cys es un aminoácido que posee un grupo tiol o sulfidrilo (-SH), capaz de formar enlaces disulfuro (-S-S-) con otros grupos -SH por medio de una reacción de oxidación (Friedman, 1973). Los grupos -SH libres también pueden participar en intercambios -SH-disulfuro con otros puentes disulfuro. Por lo tanto, las proteínas son capaces de formar puentes disulfuro intra e intermoleculares en condiciones adecuadas.

Las uniones intramoleculares se forman cuando un par de residuos de Cys quedan muy próximos durante el plegamiento de proteínas globulares y son muy importantes para la estabilización de la estructura terciaria frente a mecanismos de desplegamiento (Friedman 1973). Los enlaces disulfuro intermoleculares se forman cuando se acercan dos o más macromoléculas de proteínas y, comúnmente, se relacionan con fenómenos de agregación en sistemas gelificados y/o sobre interfaces fluidas (Dickinson y Matsumura, 1991; McClements y col. 1993).

El valor de pK del grupo -SH libre de L-Cys es de aproximadamente 8,3. Sin embargo, en proteínas el valor de pK a menudo es más elevado, dependiendo del

entorno del grupo -SH y del grado de plegamiento de la proteína (Friedman, 1973).

Los grupos -SH y disulfuro en las proteínas se encuentran normalmente en el interior de la macromolécula plegada y, por lo tanto, no están disponibles para la interacción incluso en condiciones que favorecen el intercambio -SH-disulfuro. El desplegamiento de las proteínas expone los grupos -SH reactivos y permite intercambios -SH -disulfuro en condiciones adecuadas (Dickinson y Matsumura, 1991; McClements y col., 1993). Este comportamiento explica el incremento de intercambios -SH-disulfuro que se producen durante el tratamiento térmico de proteínas (McClements y col., 1994), cuando las proteínas se adsorben sobre interfase fluidas (Dickinson y Matsumura, 1991), o cuando las proteínas son tratadas con enzimas proteolíticas tales como tripsina y quimiotripsina (Friedman, 1973).

3.1.1.7. Entropía configuracional

Uno de los factores más importantes que determina la estructura conformacional y la capacidad de interacción de los biopolímeros en solución acuosa es la entropía configuracional (Alber, 1989; Dill, 1990).

Los biopolímeros contribuyen a su entropía configuracional de manera local o no local. La entropía local se refiere al número de conformaciones que pueden adoptar las secuencias de monómeros conectadas entre sí a lo largo de la cadena de biopolímero. La formación de estructuras ordenadas, tales como hélices u hojas plegadas es entrópicamente desfavorable. La entropía no local está determinada por todas las posibles configuraciones que pueden adoptar las cadenas de biopolímero. Por lo tanto, los biopolímeros altamente flexibles (estructurados al azar) pueden tener un gran

número de conformaciones diferentes y poseen una entropía configuracional mucho mayor que los biopolímeros compactos (globulares). El solapamiento estérico desempeña un papel importante en la determinación de la magnitud de la entropía no local. De esta manera, dos segmentos de una cadena de biopolímero no pueden ocupar el mismo volumen y, por lo tanto, el número de configuraciones que puede adoptar la macromolécula está restringido (entrópicamente desfavorable).

La energía libre asociada a la entropía configuracional ($-T\Delta S$) aumenta a medida que se eleva la temperatura. Este comportamiento explica por qué las proteínas globulares se despliegan a elevadas temperaturas a pesar de la fuerte atracción hidrofóbica que mantiene su estructura globular (Dickinson y McClements, 1995).

Una consecuencia importante de la contribución de la entropía no local a la conformación de un biopolímero es el efecto de los enlaces covalentes cruzados entre diferentes segmentos de la macromolécula. La introducción de un enlace covalente, tal como un puente disulfuro en una proteína, restringe en gran medida el número de conformaciones que la macromolécula desplegada puede aportar y, por lo tanto, reduce la fuerza entrópica que favorece la conformación estructurada al azar (Kinsella, 1982).

La conformación y asociación de biopolímeros depende de su entropía configuracional y de la fuerza de las interacciones atractivas y repulsivas intra e intermoleculares (Dickinson y McClements, 1995). Si se contempla la posibilidad de que un biopolímero pueda existir en dos estados diferentes, e.g., plegado y desplegado, nativo y agregado, disociado o asociado, este va a existir en el estado que posea la menor energía libre dependiendo de las condiciones del medio acuoso (pH, fuerza iónica, la temperatura).

La energía libre de cada estado se rige por diversos tipos de interacciones

macromoleculares y por las contribuciones entrópicas antes mencionadas. Por lo tanto, el cambio total de energía libre que se produce cuando un biopolímero sufre una transición de un estado a otro puede ser representado por la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{\text{transición}} = \Delta G_{\text{VDW}} + \Delta G_{\text{H}} + \Delta G_{\text{PH}} + \Delta G_{\text{SE}} + \Delta G_{\text{E}} - T\Delta S_{\text{EC}} \quad (\text{Ec. 3.1})$$

3.1)

donde ΔG_{VDW} , ΔG_{H} , ΔG_{PH} , ΔG_{SE} y ΔG_{E} son las diferencias de energía libre entre los dos estados debido a interacciones de van der Waals, hidrofóbicas, enlaces puente de hidrógeno, solapamiento estérico y electrostáticas, respectivamente, T es la temperatura absoluta y ΔS_{EC} es el cambio en la entropía configuracional. Si $\Delta G_{\text{transición}}$ es negativo, entonces el biopolímero tiende a someterse a la transición. Cabe destacar que la mayoría de los alimentos son sistemas fuera del equilibrio, por lo que los biopolímeros no están en su estado de mínima energía libre. A menudo, un biopolímero está "atrapado" en un estado metaestable porque existe una gran energía de activación que le impide llegar a su estado de equilibrio.

3.1.1.8. Interacciones con el agua

Muchas de las propiedades funcionales (gelificación, emulsificación, espumado) de los biopolímeros en dispersiones coloidales alimenticias se rigen por sus interacciones con el agua (Damodaran, 1996; Fennema, 1996). La disolución efectiva de biopolímeros implica una serie de etapas que incluyen dispersión, humectación, hinchamiento y disolución. La velocidad de disolución depende de factores tales, como

el pH, fuerza iónica, temperatura y composición de la fase acuosa, así como también de la aplicación de fuerzas mecánicas.

La solubilidad de los biopolímeros depende de su compatibilidad con el solvente lo que depende de la fuerza de las interacciones biopolímero-biopolímero, biopolímero-solvente y solvente-solvente. Una macromolécula de biopolímero tiene una baja solubilidad en agua cuando la fuerza de las interacciones biopolímero-solvente es significativamente más débil que las interacciones biopolímero-biopolímero o solvente-solvente.

En general, la solubilidad en agua de los biopolímeros se determina por la entropía configuracional y una combinación de interacciones de van der Waals, electrostáticas, hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y solapamiento estérico. Sin embargo, la solubilidad en agua de un biopolímero es principalmente determinada por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (BeMiller y Whistler, 1996, Damodaran, 1996).

Las interacciones hidrofóbicas promueven fenómenos de agregación y, por lo tanto, pueden conducir a una escasa solubilidad en agua de proteínas globulares.

Por otra parte, una macromolécula de proteína tiene carga neta positiva a valores de pH por debajo de su punto isoeléctrico (pI) y carga neta negativa a valores de pH por encima del mismo. Consecuentemente, existe una repulsión electrostática entre las macromoléculas cargadas de mismo signo que les impide acercarse y, por lo tanto, aumenta su solubilidad en agua (de Wit y van Kessel, 1996). La solubilidad acuosa de la mayoría de las proteínas disminuye drásticamente en su pI (Franks, 1991; Damodaran 1996), debido a la disminución de la repulsión electrostática entre las macromoléculas.

La solubilidad en agua de las proteínas depende en gran medida del tipo y de la concentración de electrolitos en solución (Franks, 1991). A fuerza iónica relativamente

baja, los electrolitos apantallan las interacciones electrostáticas entre las macromoléculas. A nivel del pI, el apantallamiento disminuye la fuerza de las atracciones electrostáticas entre las proteínas y, por lo tanto, la solubilidad aumenta. A valores de pH alejados del pI, el apantallamiento reduce la repulsión electrostática entre los biopolímeros y, por lo tanto, la solubilidad disminuye. A fuerza iónica intermedia, los electrolitos se unen a la superficie de los biopolímeros e incrementan las interacciones de repulsión de corto alcance y, por lo tanto, la solubilidad aumenta (Israelachvili, 1992). Alternativamente, los electrolitos pueden alterar la organización estructural de las moléculas de agua, lo que puede incrementar o disminuir la magnitud de las fuerzas hidrofóbicas dependiendo de la naturaleza de los iones involucrados (Israelachvili, 1992; Damodaran, 1996). A fuerza iónica elevada, las proteínas precipitan por arriba de una concentración de sal crítica, lo que se conoce como “*salting out*”, debido a que la mayoría de las moléculas de agua están fuertemente asociadas a los electrolitos y, por lo tanto, no están disponibles para hidratar a las proteínas (Damodaran, 1996).

Por otro lado, una de las funciones más importantes de los biopolímeros en sistemas dispersos coloidales alimenticios (espumas y emulsiones) es aportar a la viscosidad de la subfase acuosa (Mitchell y Ledward, 1986). La viscosidad modifica la textura de los productos alimenticios (espesamiento), así como también reduce la velocidad a la cual las partículas sedimentan o creman (estabilización).

La capacidad de los biopolímeros de aumentar la viscosidad de una solución depende principalmente de su peso molecular, grado de ramificación, conformación y flexibilidad (Launay y col., 1986; Rha y Pradipasena, 1986).

La viscosidad de una solución diluida de biopolímeros aumenta linealmente a medida que aumenta su concentración según la siguiente ecuación:

$$\eta = \eta_0 (1 + 2,5\phi) \quad (\text{Ec. 3.2})$$

donde η es la viscosidad de la disolución, η_0 es la viscosidad del solvente puro y ϕ es la fracción en volumen de biopolímeros en la disolución.

En un régimen diluido, la capacidad de algunos biopolímeros de aumentar la viscosidad de las disoluciones acuosas se debe a que su fracción de volumen efectivo es mucho mayor que su fracción de volumen real (McClements, 2006). Un biopolímero gira libremente en solución debido a su energía térmica barriendo un volumen esférico de agua de diámetro aproximadamente igual a su longitud de extremo a extremo. El volumen ocupado por el biopolímero es sólo una pequeña fracción del volumen total de dicha esfera. Por lo tanto, la fracción de volumen efectivo de un biopolímero es mucho mayor que su fracción de volumen real. De esta manera, moléculas muy grandes de biopolímeros lineales aumentan la viscosidad de la disolución con mayor eficacia que macromoléculas de biopolímeros pequeños, compactos y/o ramificados (Launay y col. 1986; Rha y Pradipasena 1986).

En una solución diluida, las macromoléculas individuales de biopolímeros no interactúan entre sí (Dickinson, 1992; Lapasin y Pricl, 1995). A medida que la concentración de biopolímero aumenta por encima de un cierto valor crítico, la viscosidad de la solución aumenta rápidamente debido a que las esferas de agua llevadas por los biopolímeros comienzan a interactuar entre sí. Este tipo de disolución

que se conoce como solución semi-diluida, porque a pesar de que los biopolímeros pueden interactuar entre sí, cada biopolímero sigue estando rodeado por moléculas de solvente. A mayores concentraciones de biopolímero, las macromoléculas se empaquetan estrechamente formando una red y el sistema adquiere características de gel.

Los biopolímeros que se utilizan para espesar la subfase acuosa de espumas y emulsiones se utilizan con frecuencia en el rango de concentración semi-diluida (Dickinson, 1992). Las disoluciones que contienen biopolímeros extendidos a menudo exhiben un fuerte comportamiento pseudoplástico (Lapasin y Priel, 1995). Este fenómeno se produce por que las macromoléculas de biopolímero se alinean con el campo de corte o bien porque las interacciones biopolímero-biopolímero se debilitan. El comportamiento reológico de las disoluciones de biopolímeros juega un papel importante en la determinación de sus propiedades funcionales, en la percepción sensorial y en la estabilidad de espumas y emulsiones alimenticias.

Las proteínas y los polisacáridos pueden ser utilizados como espesantes. Sin embargo, los polisacáridos son generalmente preferidos debido a su elevado peso molecular y estructura más extendida lo que permite su utilización en concentraciones mucho más bajas.

3.1.2. Comportamiento de interacción entre biopolímeros en solución acuosa

3.1.2.1. Aspectos termodinámicos

El estudio de las propiedades fisicoquímicas de los sistemas mixtos compuestos por proteínas y polisacáridos implica abordar los fundamentos termodinámicos de las interacciones macromoleculares entre dichos biopolímeros y, entre ellos y el solvente acuoso. De acuerdo al segundo principio de la termodinámica, la mezcla de uno o más biopolímeros con el agua es sólo posible, si la energía libre de mezclado, ΔG_M , es negativa:

$$\Delta G_M = \Delta H_M - T\Delta S_M < 0 \quad (\text{Ec. 3.3})$$

donde ΔH_M y ΔS_M son la entalpía y la entropía de mezclado, respectivamente y T es la temperatura absoluta. De acuerdo a este principio, la estabilidad de tales sistemas está gobernada por la existencia de tres efectos termodinámicos: entropía de mezclado (ΔS_M), calor de mezclado (ΔH_M) dado por las diferentes fuerzas involucradas en la interacción y en menor medida por el efecto de volumen libre.

En un sistema de dos componentes (biopolímero-solvente), la entropía de mezclado, ΔS_M , representa el desorden del sistema y está dada por el número de posibles permutaciones configuracionales de las moléculas presentes en la mezcla:

$$\frac{\Delta S_M}{RV} = \left[\frac{(\varphi_1 \ln \varphi_1)}{V_1} + \frac{(\varphi_2 \ln \varphi_2)}{V_2} \right] \quad (\text{Ec. 3.4})$$

donde φ_i es la fracción de volumen del componente i en la mezcla, V_i es el volumen molar del componente i, R es la constante de los gases ($8,3144 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) y $\Delta S_M/V$ es

la variación de entropía de mezclado por volumen, V , de solución. Como φ_i es siempre < 1 , ΔS_M es positivo y, por lo tanto, contribuye negativamente a ΔG_M . De acuerdo a la Ec. 3.4, ΔG_M (Ec. 3.3) disminuye a través de ΔS_M cuando las macromoléculas son grandes debido al elevado valor que toma V_i .

El calor de mezclado, ΔH_M , se basa en la existencia de fuerzas repulsivas (hidratación, estéricas) o atractivas (hidrofóbicas, electrostáticas, de van der Waals) en el ambiente local de cada átomo o molécula que compone el sistema. Esta se define como:

$$\Delta H_M = V_m (\delta_1 - \delta_2)^2 \varphi_1 \varphi_2 \quad (\text{Ec. 3.5})$$

$$\delta_i = \left(\frac{\Delta E_i}{V_i} \right)^{1/2} \quad (\text{Ec. 3.6})$$

donde V_m es el volumen total de la mezcla, δ_i es un parámetro de solubilidad, ΔE es la energía de vaporización de un gas a presión cero, V_i es el volumen molar del componente i y $\Delta E_i/V_i$ es definida como la densidad de energía. La Ec. 3.5 muestra claramente que el valor de ΔH_M es directamente proporcional al término $(\delta_1 - \delta_2)^2$. [Scott y Hildebrand \(1951\)](#) estudiaron las variaciones de este último término y concluyeron que las fuerzas de dispersión (interacciones dipolo-dipolo inducido) contribuyen positivamente a ΔH_M ($\Delta H_M > 0$) sugiriendo la incompatibilidad entre los componentes del sistema. Por otra parte, las interacciones específicas débiles (transferencias de cargas o uniones puente de hidrógeno) contribuyen negativamente a

ΔH_M ($\Delta H_M < 0$) y por lo tanto, favorecen la compatibilidad entre los componentes del sistema ($\Delta G_M < 0$). De manera general, ΔH_M puede expresarse como sigue:

$$\frac{\Delta H_M}{RTV} = \left[\frac{z\Delta\omega_{12}}{KTV_s} \right] \varphi_1 \varphi_2 = \left(\frac{\chi_{12}}{V_1} \right) \varphi_1 \varphi_2 \quad (\text{Ec. 3.7})$$

donde z es el número de coordinación, V_s es el volumen molar de un segmento molecular, K es la constante de Boltzman ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$) y $\Delta\omega_{12}$ es la variación de energía de interacción en el sistema asociada con la existencia de un nuevo tipo de contacto entre segmentos de la especie 1 (solvente) y 2 (biopolímero). Esta variación de energía de interacción puede definirse como:

$$\Delta\omega_{12} = 2\omega_{12} - \omega_{11} - \omega_{22} \quad (\text{Ec. 3.8})$$

donde ω_{ij} es la energía de interacción entre segmentos del componente i y j , χ_{12} es el parámetro de interacción o segundo coeficiente virial entre el solvente y el biopolímero definido por Flory y Huggins (Flory, 1942):

$$\chi_{12} = \frac{(z\Delta\omega_{12}r_1)}{KT} \quad (\text{Ec. 3.9})$$

donde r_1 es el número de segmentos capaces de interactuar contenidos en el componente 1. Una combinación de las Ec. 3.3, 3.4 y 3.7 da origen a la siguiente expresión:

$$\frac{\Delta G_M}{RTV} = \frac{(\varphi_1 \ln \varphi_1)}{V_1} + \frac{(\varphi_2 \ln \varphi_2)}{V_2} + \frac{\chi_{12}}{V_1} \varphi_1 \varphi_2 \quad (\text{Ec. 3.10})$$

En el caso de dos biopolímeros de alto peso molecular, los dos primeros términos de la ecuación 3.10 se vuelven despreciables (debido a que V_1 y V_2 tienden a infinito); por lo tanto, χ_{12} se vuelve el término que gobierna ΔG_M . Además, como χ_{12}/V_1 es una función de $1/T$, este incrementa positivamente cuando disminuye la temperatura.

Por otro lado, el efecto de volumen libre resulta de un cambio en volumen de la solución luego del mezclado de las macromoléculas. El efecto de volumen libre representa la influencia de la diferencia entre los volúmenes libres del solvente y del biopolímero. Normalmente, se asume que el volumen libre del biopolímero es más pequeño que el volumen libre del solvente, debido a la diferencia de tamaño molecular. Este efecto de volumen libre es, por convención, una parte del parámetro de interacción χ_{12} . De acuerdo a [Scott \(1949\)](#), el valor crítico de χ_{12} se encuentra derivando la Ec. 3.10 e igualando a cero, para finalmente obtener:

$$\left(\frac{\chi_{12}}{V_1}\right)_{crit} = 1/2 \left[\left(\frac{1}{V_1}\right)^{1/2} + \left(\frac{1}{V_2}\right)^{1/2} \right]^2 \quad (\text{Ec. 3.11})$$

En el caso de una solución ideal, las interacciones solvente-solvente y las interacciones biopolímero-solvente son iguales; por lo tanto, el valor limitante de χ_{12} es $1/2$, lo que resulta en $\Delta H_M = 0$. Para valores de χ_{12} menores o mayores que $1/2$, el solvente es calificado como bueno o pobre, respectivamente.

En una mezcla ternaria conteniendo un solvente y dos biopolímeros, tal como proteínas y polisacáridos dispersos en agua, se definen tres parámetros interaccionales de Flory-Huggins: (i) χ_{12} y χ_{13} para la interacción entre el solvente y los dos biopolímeros y (ii) χ_{23} para las interacciones (atractivas o repulsivas) entre los dos biopolímeros. Debido al gran tamaño de los biopolímeros comparados con el solvente, χ_{23} se vuelve el factor que mayormente controla la estabilidad de la mezcla ternaria. En soluciones diluidas de biopolímeros este parámetro puede ser fácilmente determinado por experimentos de dispersión de luz estática.

El parámetro χ_{23} puede describir interacciones de tipo proteína-proteína ($\chi_{\text{prot-prot}}$), polisacárido-polisacárido ($\chi_{\text{pol-pol}}$) o proteína-polisacárido ($\chi_{\text{prot-pol}}$). Los valores negativos y positivos del parámetro $\chi_{\text{prot-pol}}$ son indicativos de interacciones atractivas y repulsivas entre ambos tipos de biopolímeros, respectivamente. Sin embargo, el comportamiento termodinámico de los sistemas mixtos proteína-polisacárido depende también de los valores relativos de los parámetros $\chi_{\text{prot-prot}}$ y $\chi_{\text{pol-pol}}$.

Por lo general, en una mezcla de biopolímeros las fuerzas de desestabilización son más grandes que las fuerzas de estabilización, por lo tanto, el sistema tiende a la separación de fases. En este caso, dos fenómenos de separación de fases pueden distinguirse, dependiendo de la naturaleza y la fuerza de interacción entre ambos biopolímeros: (i) incompatibilidad termodinámica o separación de fases segregativa y (ii) separación de fases asociativa o coacervación.

3.1.2.2. Incompatibilidad termodinámica

En un sistema acuoso donde prevalece una interacción repulsiva neta entre proteínas y polisacáridos existe una alta probabilidad de exclusión mutua de uno de los biopolímeros a partir de la vecindad local del otro. Este fenómeno se conoce como incompatibilidad termodinámica y tiene lugar cuando el parámetro $\chi_{\text{prot-pol}}$ es positivo. Además, si $\chi_{\text{prot-pol}} > (\chi_{\text{prot-prot}} \times \chi_{\text{pol-pol}})^{1/2}$, el sistema biopolimérico prefiere existir como dos fases separadas aún cuando la concentración total de biopolímeros es pequeña. Claramente, las interacciones biopolímero-solvente son favorecidas en detrimento de las interacciones biopolímero-biopolímero y solvente-solvente. Finalmente, el sistema se separa en dos fases cada una rica en uno de los dos biopolímeros. Generalmente, esta separación ocurre cuando la concentración total de los componentes macromoleculares excede el 4 %p/p (Tolstoguzov, 1997, 1998). Incluso a concentraciones totales del 1 %p/p, se han observado fenómenos segregativos en algunas soluciones mixtas de proteínas y polisacáridos (Doublier y col., 2000). A una concentración total de biopolímero moderada, la separación del sistema en dos fases depende de la carga del biopolímero, del pH y la fuerza iónica (Alves y col., 1999).

La incompatibilidad termodinámica se favorece a alta fuerza iónica y/o a valores de pH mayores que el pI de la proteína. Además la incompatibilidad puede aumentar por el efecto de otros factores: i) el aumento del peso molecular y la rigidez estructural de los biopolímeros; ii) la desnaturalización de proteínas globulares debido al incremento de la hidrofobicidad y al tamaño de las cadenas polipeptídicas agregadas y iii) el aumento de la concentración de sales y de la temperatura (Tolstoguzov, 1997).

La estructura química de los polisacáridos es el factor que más afecta la incompatibilidad y la separación de fases en sistemas de proteínas y polisacáridos. La

incompatibilidad disminuye en el siguiente orden: polisacáridos con grupos carboxilo > polisacáridos neutros > polisacáridos con grupos sulfato. Además, los polisacáridos lineales son más incompatibles con las proteínas que los polisacáridos ramificados (Grinberg y Tolstoguzov, 1997).

Por último, la incompatibilidad termodinámica también varía con la presencia de otros componentes como moléculas lipofílicas y moléculas de sacarosa, los cuales presentan, en general, un efecto negativo y positivo, respectivamente (Semenova, 1996).

3.1.2.3. Coacervación compleja

El fenómeno de coacervación compleja ocurre cuando están favorecidas las interacciones atractivas entre los dos biopolímeros, y tiene lugar cuando el parámetro $\chi_{\text{prot-pol}}$ es negativo. El sistema está constituido por una fase rica en solvente con muy poca cantidad de biopolímeros y otra fase rica en ambos biopolímeros formando lo que se conoce como coacervado. Sin embargo, dependiendo de las estructuras biopoliméricas involucradas y de las condiciones del medio acuoso (pH, fuerza iónica, etc.), la asociación entre macromoléculas puede también resultar en la formación de complejos solubles. La formación de estos complejos es usualmente reversible, dependiendo de las condiciones del medio. Los sistemas mixtos formados por polisacáridos sulfatados y proteínas son completamente compatibles en un amplio rango de valores de pH (hasta pH ~7,5) y por debajo de una concentración de sal de aproximadamente 0,3 M. Por arriba de esta concentración de sal crítica y a elevados valores de pH ocurriría la disociación de estos complejos y el sistema tendería a la

separación de fases segregativa e incompatibilidad termodinámica entre los biopolímeros (Grinberg y Tolstoguzov, 1997).

Durante la formación de complejos electrostáticos, la carga neta de los polisacáridos aniónicos va disminuyendo a medida que estos se complejan con los grupos polares de las proteínas. Esta disminución de carga neta opuesta reduce la hidrofiliidad y la solubilidad del complejo resultante.

Existe una relación entre la formación de complejos con la composición, la estructura y las propiedades de los biopolímeros. Los biopolímeros se ponen en contacto durante el complejamiento y forman zonas de unión que son regiones donde se juntan segmentos de dos o más macromoléculas de diferentes biopolímeros. La heterogeneidad de las zonas de unión en términos de tamaño y estabilidad se debe a diferencias en la estructura química, el tamaño y la forma de las cadenas que interactúan (Tolstoguzov, 1997, 1998). El área de contacto entre macromoléculas de proteínas globulares está limitada por su topografía. La conformación rígida y compacta de las proteínas globulares restringe el número de grupos con cargas opuestas capaces de interactuar unos con otros. El número de posibles zonas de unión en proteínas esféricas (como las globulares) es menor que para otras proteínas con estructuras más desordenadas y flexibles (Tolstoguzov, 1997).

3.1.2.4. Miscibilidad

Por otro lado, existe una tercera situación en la que el contacto entre diferentes biopolímeros podría ser similar al contacto que tiene lugar entre biopolímeros de la misma especie. Este fenómeno se denomina miscibilidad y el sistema permanece

homogéneo a concentraciones de biopolímeros relativamente bajas. Sin embargo, con el aumento del peso molecular de los biopolímeros, el balance entre las fuerzas repulsivas y atractivas se hace difícil y el sistema evoluciona hacia la separación de fases (Dickinson, 1994).

3.2. FUNDAMENTOS DEL COMPORTAMIENTO INTERFACIAL DE PROTEINAS

3.2.1. Tensión interfacial

Las fuerzas de atracción que existen entre las moléculas de un líquido, son de diferente magnitud dependiendo de la zona del líquido considerada. Todas las moléculas en el seno del líquido están lo suficientemente cerca y ejercen fuerzas de atracción. Por lo tanto, como consecuencia de la homogeneidad isótropa del líquido, la distribución de fuerzas también es isótropa y su resultante nula.

Por el contrario, las moléculas de la zona superficial no están rodeadas completamente por otras moléculas del líquido y, por lo tanto, estas moléculas están desequilibradas con un efecto neto hacia el seno del líquido. La distribución anisótropa de fuerzas de atracción intermoleculares sobre estas moléculas próximas a la superficie libre resulta en una fuerza neta sobre las mismas, dirigida hacia el interior del líquido y que será más intensa, cuanto más cercana a la superficie libre se encuentre la molécula en cuestión y será más baja mientras más pequeña sea dicha superficie. Es decir, para una superficie mínima se cumple una energía mínima y, por lo tanto, podemos decir que la superficie de un líquido tiende a contraerse y el efecto resultante de estas fuerzas de

contracción es lo que da origen a la tensión superficial (Israelachvili, 1992). La unidad de la tensión interfacial en el SI es $\text{J}\cdot\text{m}^{-2} = \text{N}\cdot\text{m}^{-1}$.

La interfase que separa las fases aire y agua es una superficie plana de espesor infinitesimal. A nivel molecular, las moléculas de aire y agua se entremezclan entre sí a distancias muy pequeñas (Everett, 1988). Por lo tanto, en lugar de cambiar bruscamente, la composición del sistema varía gradualmente en toda la región interfacial. Las moléculas del aire son incapaces de formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, por lo que la mezcla aire-agua es muy desfavorable a causa del efecto hidrofóbico (Hiemenz, 1986).

La termodinámica clásica define la tensión superficial (σ) como el trabajo (W) que es necesario realizar para incrementar en una unidad el área interfacial (A) (Dickinson y Stainsby, 1982). Este trabajo representa la variación de energía libre que sufre el sistema como consecuencia de un aumento de la superficie según: $W = \sigma\Delta A$. El valor de la tensión superficial da idea de lo difícil que puede resultar la formación de una espuma. Normalmente, cuanto mayor sea la tensión superficial, mayor trabajo se tendrá que aportar al sistema para aumentar el área interfacial. La adición de proteínas reduce la tensión superficial del sistema, por lo que facilita en gran medida la formación de una espuma (Bos y Van Vliet, 2001). La región de la interfase que separa el aire de la subfase acuosa constituye sólo una pequeña fracción del volumen total de una espuma. Sin embargo, tiene una influencia directa sobre las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de las espumas alimenticias, incluyendo su formación, estabilidad y reología.

3.2.2. Adsorción interfacial

3.2.2.1. Actividad superficial y fuerza impulsora

El proceso de adsorción interfacial de proteínas sobre la interfase aire-agua ejerce un rol determinante en la formación y estabilidad de una espuma (Dickinson, 1992; Damodaran 1996). La actividad superficial de una proteína es una medida de su capacidad de adsorción interfacial. Una macromolécula de proteína tiende a adsorberse sobre una interfase cuando la energía libre de su estado adsorbido es significativamente menor que la de su estado no adsorbido (Hiemenz, 1986). Esta diferencia de energía libre está determinada por los cambios en las energías de interacción entre las macromoléculas involucradas, así como también por diversos efectos entrópicos (Shaw, 1980). El cambio en las energías de interacción que se produce como consecuencia de la adsorción proviene de dos fuentes, una asociada con la interfase y la otra con la macromolécula de proteína. Los contactos directos entre las moléculas de agua y las del aire se sustituyen por los contactos entre los segmentos no polares de las proteínas y las moléculas de aire, y entre los segmentos polares de las proteínas y las moléculas de agua (Israelachvili, 1992). Estas interacciones son energéticamente más favorables que las interacciones directas entre las moléculas de agua y las de aire.

Los efectos entrópicos asociados con la adsorción se deben principalmente al hecho de que cuando una macromolécula de proteína se adsorbe sobre una interfase, esta se confina en una región de volumen considerablemente menor que el volumen que ocuparía en el seno de solución y, por lo tanto, su rotación molecular está restringida. Estos efectos son entrópicamente desfavorables y, por lo tanto, una macromolécula se adsorberá sobre una interfase si la energía adquirida es lo suficientemente grande como

para compensar la pérdida de entropía (Shaw, 1980). Cuando una proteína se adsorbe sobre una interfase se produce una disminución de energía libre del sistema manifestándose como una reducción de la tensión interfacial, i.e., menos energía se requiere para aumentar la superficie entre las dos fases inmiscibles. La magnitud de este decrecimiento depende de la fuerza de las interacciones entre los segmentos hidrofílicos y el agua y entre los segmentos hidrofóbicos adsorbidos y el aire (Israelachvili, 1992).

Existen diferentes factores (intrínsecos y extrínsecos) que afectan la actividad superficial de las proteínas y que, por lo tanto, se deben tener en cuenta al momento de elegir una proteína como agente espumante. Entre los factores intrínsecos se encuentran: la composición de aminoácidos, la relación de aminoácidos no polares y polares, la distribución de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, la presencia de puentes disulfuro y grupos tioles libres y el tamaño, la forma y la flexibilidad molecular. Entre los factores extrínsecos se pueden nombrar: el pH y la fuerza iónica del medio, la concentración de proteína, el tiempo y la temperatura a la que se expone la proteína en la interfase y la aplicación de energía mecánica (Damodaran, 1996).

La adsorción interfacial de proteínas es el resultado neto de diferentes interacciones con los componentes del sistema, incluyendo a la propia interfase (Graham y Phillips, 1979; Damodaran y Song, 1988; MacRitchie, 1990). La fuerza impulsora que favorece la adsorción de una proteína sobre la interfase aire-agua es el efecto hidrofóbico que tiene lugar cuando algunos de los grupos no polares de la proteína quedan en contacto con el agua, lo que es termodinámicamente desfavorable. Sin embargo, otros tipos de interacción también pueden contribuir a la actividad superficial, e.g., fuerzas de van der Waals (fuerzas de dispersión, orientación e

inducción), interacciones electrostáticas, estéricas y puentes de hidrógeno, etc. (Damodaran y Song, 1988).

3.2.2.2. Cinética de adsorción

La tendencia de una proteína a existir, ya sea en la subfase acuosa o en la región interfacial se rige por principios termodinámicos. Sin embargo, la velocidad a la que una macromolécula de proteína se adsorbe sobre una interfase aire-agua está determinada por procesos de transporte, e.g., difusión o convección, y por barreras de energía asociadas al proceso de adsorción interfacial, e.g., disponibilidad de sitios libres, interacciones de repulsión electrostática, estérica, etc. (Damodaran y Song, 1988).

La velocidad de adsorción interfacial depende fuertemente de las características moleculares de la proteína (tamaño, conformación e interacciones), la naturaleza de la fase continua y de las condiciones del proceso, tales como temperatura, método de formación de la espuma (batido o burbujeo), etc. La velocidad de adsorción debe ser suficientemente rápida como para que las proteínas puedan adsorberse sobre la interfase de las burbujas creadas durante la formación de la espuma. En este sentido, las características más importantes que debe reunir una proteína son: (i) capacidad para reducir la tensión interfacial, (ii) grado de adsorción interfacial, (iii) capacidad de desorción, (iv) posibilidad de cambiar su conformación durante y después de la adsorción, (v) espesor y resistencia mecánica de la monocapa adsorbida y (vi) capacidad de interacción entre los distintos segmentos adsorbidos (Bos y Van Vliet, 2001; Dickinson y McClements, 1995; Kim y Kinsella, 1985; Walstra, 1996).

El estudio de la cinética de adsorción de proteínas es esencial para el conocimiento y control de procesos dinámicos que tienen lugar durante la producción de espumas alimenticias. Este hecho ha motivado el desarrollo de un gran número de métodos para determinar las velocidades de adsorción (Brash, 1981). Sin embargo, la cinética de adsorción de una proteína sobre la interfase aire-agua, comúnmente, puede seguirse a través de la evolución temporal de la presión superficial o de las propiedades mecánicas de la película (bajo condiciones de dilatación o de cizalla).

La adsorción de una proteína sobre la interfase aire-agua tiene lugar a partir de tres mecanismos cinéticos:

(i) Durante la primera etapa, a bajas presiones superficiales, la cinética está controlada por la velocidad de difusión de la proteína hacia la interfase aire-agua. En ausencia de convección, la macromolécula de proteína difunde rápidamente hacia la interfase dependiendo de su hidrofobicidad, tamaño y forma, de su capacidad de colisionar con la interfase y de su concentración en solución (Tornberg, 1978).

(ii) En una segunda etapa, la proteína se adsorbe, penetra y se despliega sobre la interfase aire-agua. Para cubrir el área máxima de la película adsorbida, las macromoléculas que arriban a la interfase se despliegan y se desnaturalizan parcialmente. El grado de desplegamiento de las proteínas globulares durante la adsorción depende de numerosos factores, tales como estabilidad y flexibilidad conformacional, concentración en solución, etc. (Dickinson, 1992; Wilde y Clark, 1996). Cuando la concentración de la proteína adsorbida aumenta, se genera una barrera electrostática sobre el lado acuoso de la superficie debido a la orientación preferencial de los grupos proteicos cargados hacia la subfase acuosa polar. Por lo tanto, las nuevas macromoléculas proteicas para adsorberse requieren una energía cinética adecuada para

superar la barrera electrostática (que involucra fuerzas repulsivas, impedimentos estéricos y osmóticos) y también requieren comprimir las macromoléculas ya adsorbidas en la interfase, para permitir la adsorción de proteína adicional. En esta etapa del proceso, la velocidad está determinada por la capacidad de las macromoléculas proteicas para penetrar en la interfase y reacomodarse.

(iii) Finalmente, en una tercera etapa, tiene lugar el reordenamiento de la proteína sobre la interfase produciendo en muchas ocasiones una película gelificada. Las proteínas adsorbidas sufren reordenamientos estructurales con el fin de maximizar el número de contactos entre los grupos no polares y la interfase (Bos y Van Vliet, 2001) y para lograr un estado de menor energía libre (Phillips y col., 1994). Con el aumento de la cantidad de proteína adsorbida, el reordenamiento de las macromoléculas en forma extendida disminuye y la película cambia de estado expandido a comprimido (Kinsella y Phillips, 1989). Este proceso puede ser retardado por varios eventos como ser: presencia de una barrera de adsorción, reordenamientos moleculares lentos y/o transiciones de fase en la superficie, etc. (Lucassen Reynders, 1993). En una interfase fluida, las proteínas desordenadas son flexibles, por lo que pueden reorganizar sus estructuras con bastante rapidez, mientras que las proteínas globulares son macromoléculas más rígidas y, por lo tanto, se reorganizan más lentamente. El desplegamiento de una proteína globular sobre una interfase expone los aminoácidos que se encuentran originalmente en el interior hidrofóbico de la macromolécula, lo que conduce a una mayor interacción con proteínas adsorbidas vecinas a través de interacción hidrofóbica y/o formación de puentes disulfuro (Dickinson y Matsumura, 1991). Tales cambios conformacionales pueden ser vistos como una desnaturalización interfacial (Dagleish, 1996). En consecuencia, las proteínas globulares tienden a formar

películas adsorbidas relativamente delgadas, compactas y de elevada viscoelasticidad (Dickinson, 1992).

En ocasiones, la adsorción de una proteína sobre la interfase aire-agua va precedida de un tiempo de inducción. En términos físicoquímicos, éste es el tiempo que transcurre para que las interacciones entre las macromoléculas de la proteína en la vecindad de la interfase tengan repercusión sobre alguna propiedad interfacial mensurable, como la presión superficial o las propiedades reológicas superficiales. En general, el tiempo de inducción disminuye o desaparece, la velocidad de difusión aumenta y las propiedades mecánicas de las películas adsorbidas mejoran con el aumento de la concentración de proteína en disolución.

3.2.3. Propiedades mecánicas

El conocimiento de la reología interfacial de las películas de proteínas es importante en relación a la estabilización de espumas alimenticias (Halling, 1981). La mayoría de los sistemas que contienen proteínas sobre interfases fluidas están sometidos a procesos dinámicos alejados del equilibrio. Estos fenómenos dinámicos y el desarrollo de interacciones intermoleculares pueden conducir a alteraciones de las propiedades dinámicas de la interfase que tienen consecuencias reológicas mensurables. En efecto, durante la adsorción de la proteína se produce un mejoramiento de las propiedades mecánicas como consecuencia de las mayores interacciones entre los grupos de aminoácidos adsorbidos sobre la interfase (Murray, 2002; Rodríguez Patino y Rodríguez Niño, 1999; Rodríguez Patino y col., 2007).

Las interacciones macromoleculares, el espesor de la película, la presión superficial desarrollada y las propiedades viscoelásticas están muy influenciadas por la carga neta de la proteína. Las películas formadas a valores de pH cercanos al pI son más condensadas, más fuertes y se forman más rápido. La formación de uniones disulfuro durante la formación de la película también aumenta la estabilidad. La fuerza de las películas proteicas tiende a incrementarse con el tiempo, reflejando reordenamientos y el incremento de las interacciones entre las macromoléculas componentes de la película (Kinsella y Phillips, 1989). Además, las características reológicas son muy sensibles a las estructuras que la monocapa de proteína adsorbida adopta sobre la interfase aire-agua (Rodríguez Patino y col., 2003).

Las propiedades reológicas que se pueden determinar en una película adsorbida de proteína son diferentes dependiendo del tipo de deformación interfacial aplicada (Lucassen Reynders, 1993). Normalmente, existen dos tipos de deformación interfacial (i) de cizalla, donde se somete a la película a esfuerzos que originan cambios en su forma, o (ii) dilatacional, donde se somete a la película a compresiones y expansiones que modifican su área.

La reología interfacial de cizalla refleja la fuerza de atracción neta entre los segmentos de proteínas adsorbidos en la película interfacial y entre estos y las capas de líquido de la subfase continua. La viscosidad superficial de cizalla (η_s) es la fuerza requerida para desplazar y mover las macromoléculas adsorbidas de un punto a otro de la interfase y refleja la resistencia mecánica de la película interfacial frente a los esfuerzos de corte o de cizalla aplicados sobre la superficie.

Por otro lado, la reología interfacial dilatacional implica la deformación sinusoidal del área que ocupa la película y, como consecuencia de tal deformación, mide la

variación sinusoidal resultante en la tensión superficial. La deformación aplicada está caracterizada por una amplitud y una frecuencia de oscilación. La respuesta sinusoidal de la presión superficial posee la misma frecuencia que la deformación aplicada, pero puede estar o no en fase con ésta dependiendo de las características viscoelásticas de la película. La elasticidad y la viscosidad dilatacional se pueden combinar en un único parámetro, el módulo viscoelástico dilatacional superficial de la película (E) que vincula la variación de la presión superficial (π) con los cambios del área interfacial, $E = -d\pi/d\ln A$ (Kim y Kinsella, 1985). Las propiedades reológicas dilatacionales superficiales poseen una gran relevancia y correlación con los mecanismos de formación y estabilidad de espumas debido a la existencia de movimientos de compresión y expansión que sufre la interfase durante los fenómenos de espumado (Murray, 2002; Rodríguez Patino y col., 2003).

Además, las condiciones medioambientales (temperatura, pH, fuerza iónica, sales, presencia de lípidos o fosfolípidos, etc.) (Damodaran, 1996) y las modificaciones físicas, químicas y enzimáticas tienen incidencia directa sobre las características estructurales y mecánicas de las películas adsorbidas de proteínas (Horne y Rodríguez Patino, 2003; Rodríguez Patino y col., 2003, 2007).

3.3. FUNDAMENTOS DEL COMPORTAMIENTO ESPUMANTE DE PROTEINAS

3.3.1. Sistemas coloidales

El término coloide fue introducido por el físico escocés Thomas Graham en 1861 y proviene de la palabra griega *kolos* que significa pegarse. Este comportamiento se vincula con una de las principales propiedades de los coloides que es su tendencia espontánea a agregarse.

Los sistemas coloidales son sistemas heterogéneos constituidos por dos fases y se caracterizan por poseer un gran área interfacial. Los coloides pueden definirse como “partículas” (o un conjunto de moléculas agregadas) suspendidas (formando una fase dispersa o discontinua) en un medio de dispersión denominado solvente (o fase continua) donde el tamaño de dichas partículas es mucho mayor que el tamaño de las moléculas que componen el solvente. Atendiendo al estado físico de la fase dispersa y continua, los sistemas dispersos se pueden clasificar según la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Tipos de sistemas dispersos en función del estado físico de sus fases constituyentes.

Fase	Dispersa		
Continua	Gas	Líquido	Sólido
Gas	–	Aerosol líquido	Aerosol sólido
Líquido	Espuma	Emulsión	Sol
Sólido	Espuma sólida	Gel	Composite

La diferencia relativa entre los tamaños de las partículas del solvente y las partículas coloidales hace difícil establecer un límite superior o inferior para el tamaño de los coloides, o para clasificar que sustancias pueden ser consideradas como sistemas coloidales. Sin embargo, una propiedad que caracteriza a las suspensiones coloidales es

lo que se conoce como movimiento Browniano, definido como el efecto acumulativo de múltiples colisiones entre partículas del solvente y partículas coloidales.

Las propiedades de un sistema coloidal están fuertemente determinadas por las características de la fase dispersa, de la fase continua y de la interfase formada. Así, la carga eléctrica, tamaño, estructura, entre otros, de la fase dispersa son determinantes a la hora de evaluar las propiedades de un sistema coloidal. Además, los coloides no se encuentran en un estado de mínima energía libre, es decir, no son estables desde el punto de vista termodinámico, fundamentalmente debido a su gran área interfacial.

Los sistemas coloidales con mayores aplicaciones en la industria alimentaria son emulsiones, espumas y geles. En sistemas alimenticios reales, por lo general, estos sistemas constituyen coloides múltiples formados por diversas sustancias, en distintos estados físicos y diversas agrupaciones (Dickinson y McClements, 1995; Rodriguez Patino y col., 2008). Así, por ejemplo, un helado es una emulsión, una espuma, una suspensión y quizás también un gel, ya que contiene gotas de grasa, burbujas de aire y cristales de hielo, dispersos en una fase acuosa continua, y agregados en una matriz semisólida congelada con estructura cremosa.

3.3.2. Concepto termodinámico y cinético de estabilidad coloidal

Los sistemas coloidales son sistemas termodinámicamente inestables, debido a que presentan una mayor energía libre que la energía libre de las fases individuales. Por ello, no se forman espontáneamente, sino que requieren un aporte de energía para incrementar su área interfacial (Aksenenko y col., 2006). Un sistema coloidal se considera estable cuando resiste cambios en sus propiedades con el tiempo. La

inestabilidad puede ser de tipo física si se altera la distribución espacial o estructural de la organización de las moléculas o de tipo química si se altera la estructura química de las mismas.

El concepto de estabilidad también depende del producto coloidal que se quiere elaborar. Así, existen coloides alimenticios que sólo deben ser estables durante segundos, minutos u horas (e.g. bebidas espumantes, cerveza, premezclas de helados y margarinas) mientras que otros han de permanecer estables durante días o meses (e.g., mayonesas, aderezos) (Rodríguez Niño y Rodríguez Patino, 1995; Rodríguez Patino y col., 2008).

Muchos sistemas coloidales sólo son estables termodinámicamente cuando sus partículas están unidas en una estructura única homogénea de fase dispersa. Por lo tanto, cualquier estabilidad aparente ha de ser considerada como un fenómeno puramente cinético ya que un coloide no se forma espontáneamente y cuando lo hace es termodinámicamente inestable o, al menos metaestable. Un aspecto importante es la velocidad de cambio, así, si la velocidad a la que el coloide cambia es lo suficientemente lenta, en la escala de tiempo en la que interesa que el producto se mantenga intacto, se puede decir que el coloide es estable. Por lo tanto, es fundamental definir el tiempo de utilización del alimento para establecer un criterio adecuado de estabilidad para el sistema coloidal (Rodríguez Niño y Rodríguez Patino, 1995; Rodríguez Patino y col., 2008).

Por lo anteriormente expuesto, es posible estudiar la estabilidad de los sistemas coloidales desde dos puntos de vista: termodinámico y cinético (Dickinson y Semenova, 1992).

La estabilidad termodinámica informará si un proceso ocurrirá o no, mientras que la estabilidad cinética informará sobre la velocidad a la que éste ocurre (Malysa y Lunkenheimer, 2008). La estabilidad termodinámica se relaciona con la variación de la energía libre que experimenta un sistema coloidal consistente en una fase dispersa y otra continua antes y después de su formación (Hunter, 1989; McClements, 2005). La variación de energía libre (ΔG) puede expresarse de la siguiente forma:

$$\Delta G = \sigma(\Delta A) - T(\Delta S_{\text{configuracional}}) \quad (\text{Ec. 3.12})$$

donde ΔA es el área interfacial, σ es la tensión superficial y T es la temperatura absoluta. Sin embargo, en la mayoría de los coloides alimentarios, la entropía configuracional ($\Delta S_{\text{configuracional}}$) es mucho menor que la energía libre interfacial, por lo que puede despreciarse (Hunter, 1989). De esta forma, la energía libre total asociada con la formación de un sistema coloidal resulta:

$$\Delta G = \sigma(\Delta A) \quad (\text{Ec. 3.13})$$

Por lo tanto, la formación de un sistema coloidal es siempre termodinámicamente desfavorable, ya que siempre existe un aumento del área interfacial después de su formación. Sin embargo, puede darse el caso de que el término de la entropía configuracional domine sobre el de energía libre interfacial, tal es el caso de las microemulsiones (Hunter, 1989).

La variación de energía libre asociada con la formación de un sistema coloidal determina si éste es termodinámicamente estable o no, pero no brinda información sobre la velocidad a la que sus propiedades cambian con el tiempo, el tipo de cambios que ocurren, o cual es el mecanismo físico responsable de dichos cambios.

La estabilidad cinética de dispersiones coloidales (emulsiones o espumas) solamente puede ser entendida considerando su naturaleza dinámica. Las partículas (gotas o burbujas) en una dispersión están continuamente en movimiento y, frecuentemente, chocan entre sí, debido a su movimiento Browniano, a la fuerza de la gravedad, o a la aplicación de una fuerza externa.

El hecho de que las partículas se muevan independientemente, permanezcan asociadas unas con otras, o bien, se fundan conjuntamente después de una colisión, depende de la naturaleza de las interacciones que existan entre ellas. Esto quiere decir, que la estabilidad cinética de las dispersiones dependerá en gran medida de la naturaleza de dichas interacciones, y de los factores que determinan el movimiento de las partículas en la dispersión.

Por lo tanto, para crear una dispersión que sea cinéticamente estable por un período de tiempo razonable, se necesita la presencia de un agente tensioactivo (emulsionante o espumante) y/o de un agente espesante (Dickinson y Semenova, 1992).

3.3.3. Espumas alimenticias

Una espuma es un sistema bifásico en el que una fase dispersa gaseosa está rodeada de una fase continua líquida (Dickinson y Semenova, 1992; Thiansilakul y col., 2007).

En la Figura 3.6 se puede observar que las burbujas están dentro de una red de bordes de Plateau, los que se forman en una región donde coinciden tres *lamellas* (o películas delgadas) que constituyen las paredes de las burbujas. Estas burbujas de gas dan cuerpo y uniformidad al sistema, asegurando propiedades reológicas uniformes y facilitando la dispersión de sabores.

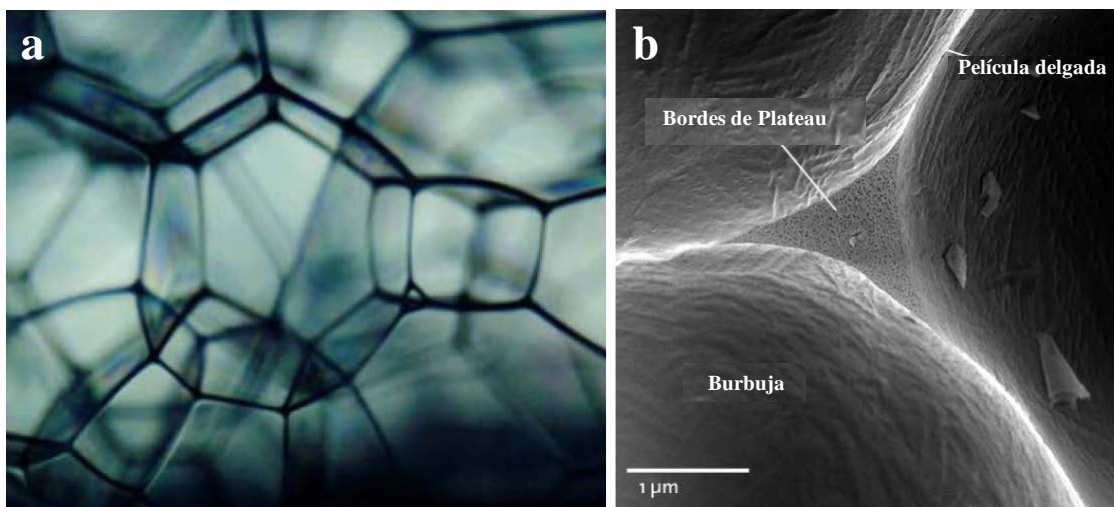


Figura 3.6. Estructura general de una espuma líquida (a). Micrografía de una espuma en la región de un borde de Plateau (b).

Para asegurar la estabilidad de una espuma, la película debe poseer una cohesión molecular adecuada y un cierto grado de elasticidad que le permita resistir deformaciones localizadas. Según el tamaño de la burbuja y el espesor de la pared, una espuma puede ser casi tan densa como la fase líquida continua o casi tan ligera como la fase gaseosa dispersa (Fennema, 1996). Se puede hacer una clasificación de las espumas líquidas en términos estructurales distinguiéndose los siguientes tipos de espumas:

(i) *Espumas esféricas*: donde la cantidad de gas introducido en el líquido es lo suficientemente baja como para que las burbujas formadas mantengan su forma esférica (e.g., helados).

(ii) *Espumas poliédricas*: donde la relación gas/líquido es tan elevada que las burbujas se ven presionadas unas con otras disponiéndose en una estructura tipo panel de abejas (e.g., espuma de la cerveza).

(iii) *Espuma transitoria*: su denominación se debe a su comportamiento cinético, siendo su vida media del orden de segundos o minutos (e.g., espuma de champagne).

(iv) *Espumas permanentes*: aunque no son estables indefinidamente poseen una vida media del orden de días, por lo que se puede decir que son metaestables (e.g., merengue de tortas).

3.3.4. Formación de espumas

Una proteína como agente espumante debe exhibir dos efectos fundamentales sobre la espuma: tensioactividad y capacidad de formación de una película interfacial con propiedades mecánicas adecuadas para impedir su inmediata destrucción, de manera simultánea para lograr espumas estables (Walstra, 1989). Por lo general, el aumento de la velocidad de difusión de la proteína hacia la interfase viene acompañado de una rápida formación de la película con propiedades mecánicas adecuadas para evitar la recoalescencia de las burbujas formadas y su destrucción prematura (Rodríguez Patino y col., 2008).

Los factores extrínsecos (dependientes del medio acuoso) que afectan a las propiedades espumantes de las proteínas en particular son: la concentración, solubilidad, pH, fuerza iónica; mientras que los factores intrínsecos de la proteína son: hidrofobicidad total y superficial, carga neta y superficial, flexibilidad y conformación molecular y susceptibilidad al trabajo mecánico durante el espumado (Holmberg, 2002).

El proceso de formación de una espuma consiste en incorporar gas a una solución que contiene la proteína (Figura 3.7) con la creación de una nueva área interfacial, es decir, formación de burbujas rodeadas por una película de proteína adsorbida sobre la interfase aire-agua.

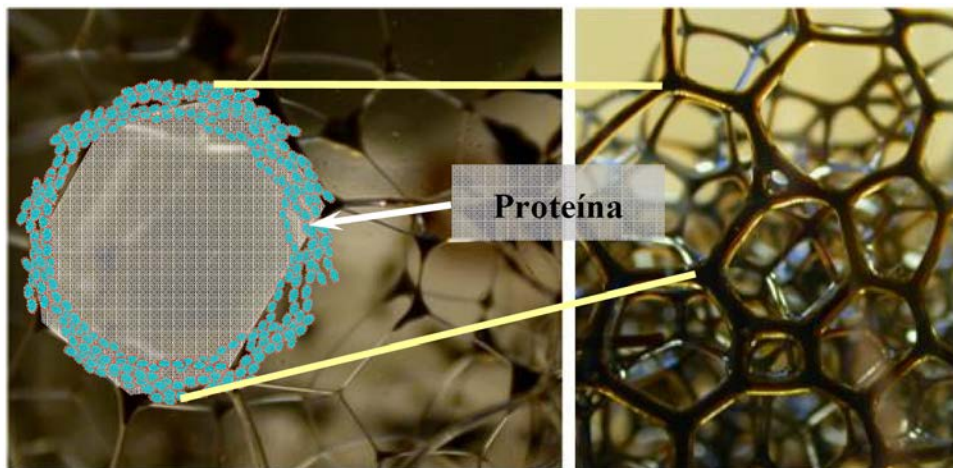


Figura 3.7. Representación de la formación de una espuma a partir de una dispersión de proteína

Una espuma se puede obtener por diferentes métodos: (i) Sobresaturación de un líquido con gas mediante: disolución de gas bajo presión, seguido de su liberación por descenso de la presión (e.g., gaseosas, cerveza) o por formación de gas in-situ (e.g., masas fermentadas) y (ii) Por medios mecánicos mediante inyección de gas a través de

un orificio de diámetro pequeño (burbujeo) o bien por batido o agitación de una fase fluida con una cantidad ilimitada de gas.

La creación eficaz de espumas alimenticias se basa en la adsorción rápida sobre la interfase recién formada. En consecuencia, la capacidad óptima de formación de espuma se realiza en condiciones que reduzcan el período de latencia o que induzcan una difusión más rápida de la proteína hacia la interfase. Esto a su vez, facilita la formación de una película elástica. Contar con un elevado valor de presión superficial es un importante requisito, a fin de producir pequeñas burbujas, y al mismo tiempo es necesario un cierto valor de la elasticidad interfacial para estabilizar las burbujas durante su formación (Rodríguez Patino y col., 2008).

3.3.5. Estabilidad de espumas

La estabilidad de una espuma está determinada por la tensión superficial y la viscosidad de la fase continua, las propiedades de la película interfacial, la temperatura, el movimiento a que se somete, y la naturaleza de la fase gaseosa dispersa. Los tres primeros factores guardan una relación directa con la naturaleza de los solutos presentes en la subfase acuosa, tales como proteínas, azúcares, polisacáridos, sales, etc.

La estabilidad de una espuma depende en gran medida del tamaño de las burbujas de la fase dispersa, de la naturaleza de las interacciones existentes entre ellas, de la relación en volumen entre ambas fases y de la diferencia de densidad de las mismas. Las espumas también pueden permanecer estables por la repulsión electrostática entre las partículas de la fase dispersa o por adición de sólidos finamente divididos (Damodaran y Paraf, 1997).

La estabilidad de una espuma frente a los diferentes mecanismos que propician su destrucción requiere el concurso de diferentes propiedades superficiales, tales como la presión superficial a tiempos prolongados de adsorción y las características estructurales, topográficas y mecánicas de la película de proteína adsorbida (Rodríguez Patino y col., 2008).

Normalmente, la estabilidad de la espuma se favorece con aquellos factores que tienden a aumentar la cantidad de proteína adsorbida sobre la interfase aire-agua (cuantificada mediante el valor de la presión superficial en el equilibrio) y con la existencia de mayores interacciones entre las macromoléculas adsorbidas sobre la interfase (cuantificada mediante el módulo dilatacional superficial a tiempos prolongados de adsorción).

El efecto de las propiedades dilatacionales, en especial el valor del módulo dilatacional en la adsorción interfacial a largo plazo, en la estabilidad de la espuma depende específicamente de la proteína y de su concentración en solución acuosa (Rodríguez Patino y col., 2008).

3.3.6. Procesos de desestabilización de espumas

El proceso de desestabilización de una espuma consiste en la tendencia de la fase gaseosa discontinua a formar una fase continua por aproximación y/o fusión de las burbujas, a fin de alcanzar un mínimo de área superficial (condición de mínima energía libre). A este proceso se opone la película proteica superficial, que como barrera mecánica es más efectiva cuanto mayor sea su viscoelasticidad y rigidez.

Existen tres mecanismos de desestabilización de una espuma que pueden actuar simultáneamente. Estos mecanismos son: drenaje, difusión o desproporción y colapso o coalescencia.

3.3.6.1. Drenaje

El drenaje consiste en la migración del líquido contenido en la espuma hacia el seno de la fase líquida debido al concurso de factores tales como la acción de la gravedad, viscosidad y densidades de la subfase y de la película interfacial expuesta a la subfase acuosa, pero de estos hay que destacar dos procesos. Por un lado, el líquido drena desde las *lamellas* hacia los bordes de Plateau debido a un gradiente en la presión de Laplace:

$$\Delta P = \frac{2\sigma}{R} \quad (\text{Ec. 3.14})$$

donde ΔP es la diferencia de presión, γ es la tensión superficial entre fases y R el radio de curvatura de la burbuja. Por otro lado, la gravedad puede provocar por su cuenta el drenaje mediante dos formas: (i) directamente en el líquido, en una película no horizontal, o (ii) indirectamente, sobre el poder de succión de los bordes Plateau. De esta manera, el drenaje de líquido también puede tener lugar en una *lamella* o a nivel de los bordes de Plateau.

Existen dos mecanismos que contribuyen al drenaje en una *lamella*:

(i) Flujo viscoso de líquido a través del interior de la película. Existe una propiedad única de una película estabilizada por un tensioactivo llamada “elasticidad de Gibbs” (Prins, 1988). Según esta propiedad, el flujo viscoso a través de una lámina vertical tiene lugar de manera que las dos superficies de la película permanecen estáticas. El líquido se mueve como si estuviese entre dos paredes sólidas paralelas. En este proceso de drenaje, el esfuerzo de corte (o de cizalla) provocado por el movimiento del líquido en la *lamella* de paredes inmóviles es contrarrestado por el gradiente de tensión superficial que actúa desde el fondo hacia la parte superior de la película. Este gradiente compensa exactamente el peso de la película.

(ii) Actuación de un proceso complejo denominado regeneración marginal. Este proceso consiste en la migración del líquido desde las partes de la película de menor grosor hacia las zonas de mayor grosor y, posteriormente, a los bordes de Plateau (Figura 3.8). Este mecanismo de drenaje es mucho más efectivo que el provocado simplemente por la gravedad. Asumiendo que ambos bordes de Plateau tienen el mismo poder de succión, se demuestra que existe una fuerza por unidad de longitud actuando en la dirección de la zona gruesa. Esto se debe a que se produce un incremento de presión (ΔP) mayor en la zona gruesa que en la zona delgada. Así, la fuerza neta por unidad de longitud (F_{bp}) es:

$$F_{bp} = (\Delta P)(\Delta d) \quad (\text{Ec. 3.15})$$

donde Δd es la diferencia de grosor existente. El efecto global de la regeneración marginal es un adelgazamiento de la película líquida. Este proceso tiene lugar de una

manera mucho más rápida que el drenaje debido al flujo viscoso entre superficies inmóviles. Este proceso de regeneración marginal sólo puede tener lugar en las películas líquidas que tienen superficies “móviles”. En muchos sistemas estabilizados por proteínas, en los que las películas son demasiado rígidas, no se produce la regeneración marginal, por lo tanto, el drenaje tiene lugar sólo por flujo viscoso.

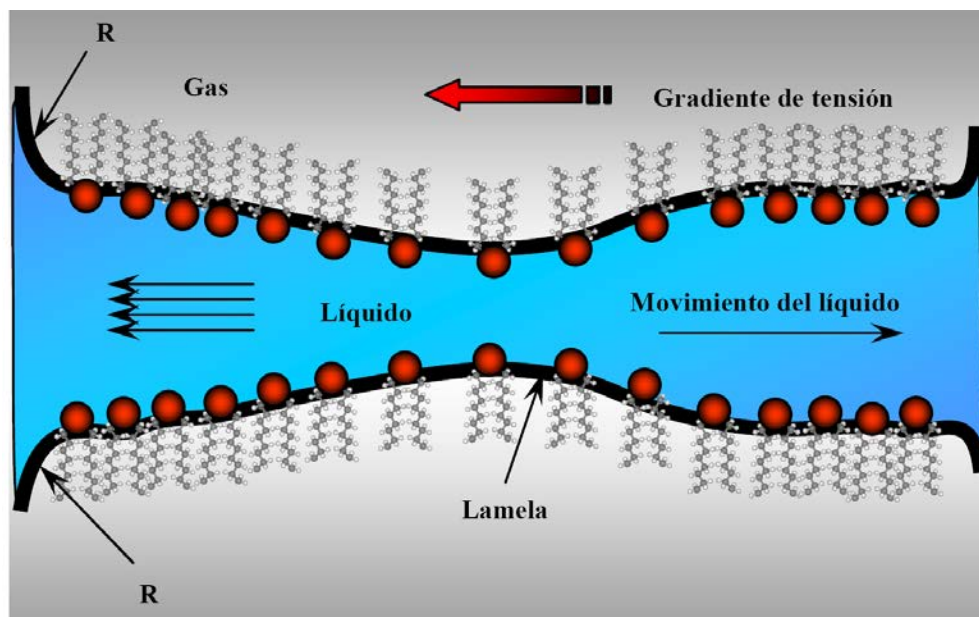


Figura 3.8. Representación esquemática de la regeneración marginal. La zona de constricción se va desplazando desde la zona delgada de la *lamella* hasta la zona gruesa provocando el movimiento del líquido.

Por otro lado, el drenaje a nivel de un borde de Plateau tiene lugar en una espuma recién formada, donde los bordes de Plateau contienen gran cantidad de líquido, y este drena, en parte, antes de que se alcance la situación de equilibrio. El drenaje de los bordes de Plateau se detiene cuando el poder de succión se iguala a la presión hidrostática del líquido.

3.3.6.2. Difusión o desproporción

La difusión, maduración de Ostwald o desproporción consiste en el transporte o movimiento del gas contenido en las burbujas pequeñas hacia las más grandes (Ettelaie y col., 2008; Murray, 2002).

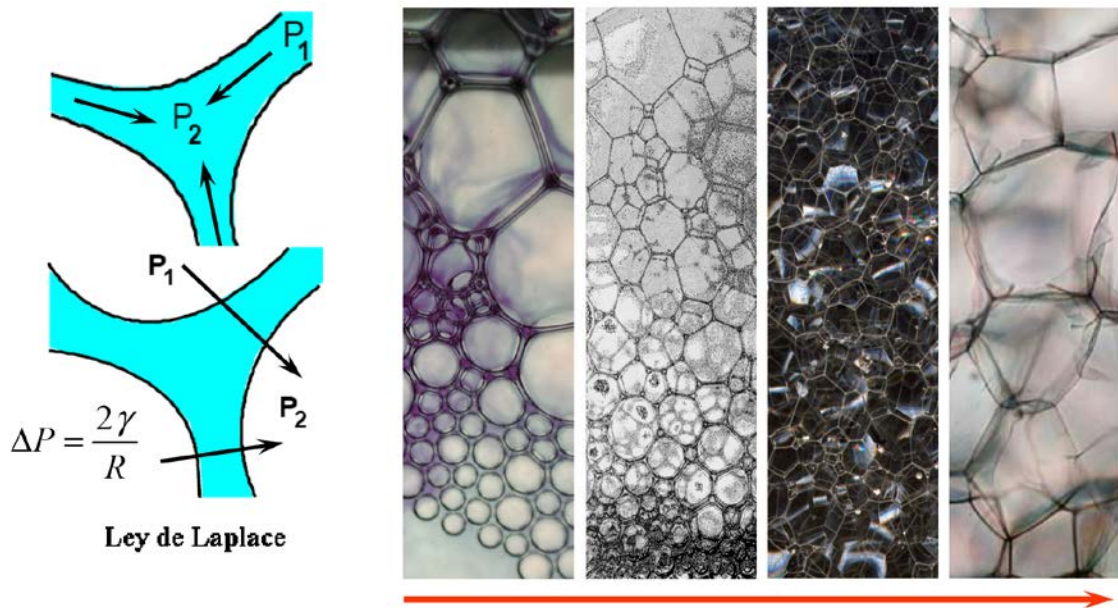


Figura 3.9. Evolución de una espuma por difusión gaseosa: de espuma esférica a espuma poliédrica. P (Presión), ΔP (diferencia de presión), γ (Tensión superficial), R (Radio de cobertura).

La fuerza impulsora de este proceso es un gradiente en la presión de Laplace a nivel de la superficie curvada de las burbujas, resultando en una mayor presión superficial para las burbujas pequeñas. Esto conduce a que las burbujas asuman una forma poliédrica por compresión de unas contra otras (Figura 3.9).

De acuerdo con la ley de Henry, la solubilidad de un gas es proporcional a su presión, por lo tanto, la solubilidad es mayor dentro de una burbuja pequeña que en el interior de una grande. Este proceso es auto-acelerado, ya que las burbujas pequeñas se

hacen cada vez más pequeñas debido a la difusión y por lo tanto la fuerza impulsora aumenta.

3.3.6.3. Colapso o coalescencia

El colapso o coalescencia de espumas es la fusión de dos burbujas causada por la ruptura de la pared que las separa. Dicha ruptura puede deberse a diversos fenómenos:

(i) *Formación de un hueco o cavidad en la película:* este fenómeno se debe normalmente a perturbaciones locales, causadas por vibraciones, partículas de polvo o choque térmico. El hueco comienza a expandirse rápidamente a lo largo del resto de la película, ya que se produce una situación energéticamente favorable. Para que se forme un hueco en la película se ha de superar un cierto valor límite o umbral de energía libre.

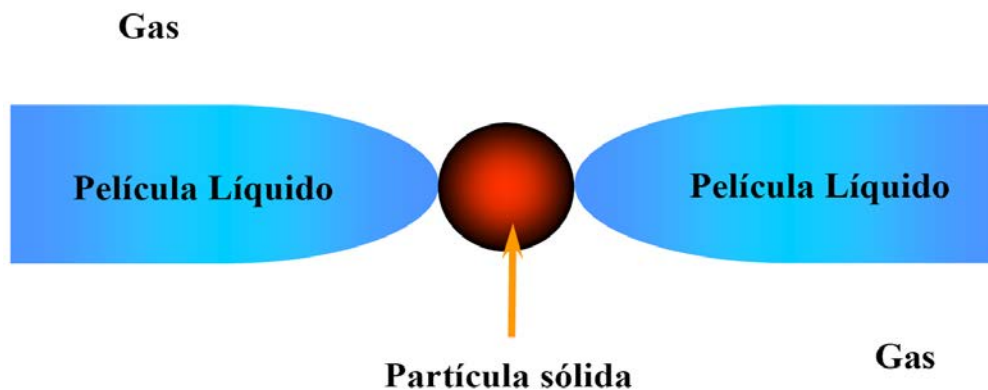


Figura 3.10. Representación esquemática del contacto entre una partícula hidrofóbica y dos superficies líquidas.

(ii) *Mecanismo de partículas hidrofóbicas:* Cuando una partícula hidrofóbica (e.g., cristales de grasa, por ejemplo) toca las superficies de una película, provoca la

formación de una zona convexa en los puntos de contacto de la partícula con la película (Dickinson y col., 2004; Du y col., 2003). La elevada presión de Laplace en esta parte de la película permite al líquido fluir lejos de la partícula. El líquido sigue drenando hasta que se rompe el contacto con la película y se produce el hueco. Este mecanismo toma lugar sólo cuando la partícula toca ambas partes de la película, lo que significa que el grosor de la partícula ha de ser, al menos, igual al espesor de la película (Figura 3.10).

(iii) *Mecanismo de esparcimiento de partículas:* Cuando en una película líquida existen partículas dispersas en su superficie, la película puede colapsar por dos motivos: a) por disminución de la capacidad tensioactiva original del agente espumante debido al material disperso o b) por esparcimiento de la partícula en la superficie de la película líquida, lo que conduce a un adelgazamiento local en la película y en su última instancia a la ruptura de la misma. El esparcimiento tiene lugar más fácilmente cuando la partícula está en contacto con la película superficial (Figura 3.11).

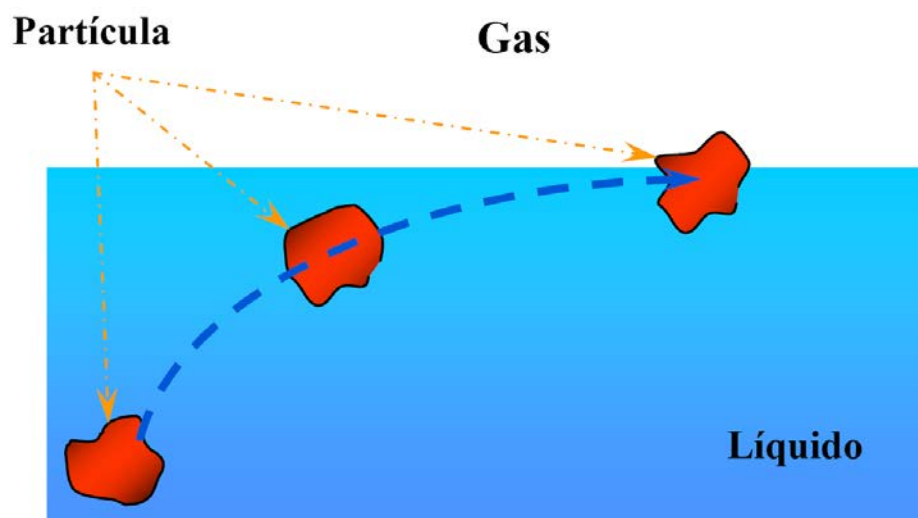


Figura 3.11. Representación esquemática del contacto entre una partícula con la superficie y ruptura de la película.

(iv) *Colapso por evaporación:* La evaporación de agua de las películas delgadas juega un papel muy importante en la desestabilización de espumas, especialmente en las zonas expuestas al exterior. La evaporación conduce a un adelgazamiento de la película líquida por debajo del grosor mínimo para que colapse. Además, se produce un aumento de la concentración de agente espumante en la superficie debido a la evaporación de agua, que actúa como una desestabilización extra.

El efecto negativo es mayor en una zona delgada de la película que en una zona gruesa, ya que la tensión superficial es menor en la zona delgada. Este hecho se debe a que la zona más delgada se estrecha a favor de la zona más gruesa, haciendo la película aún más inestable (Prins, 1988; Prins y Van Kalsbeek, 1998).

Capítulo 4

MATERIALES Y METODOS

4.1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS POLISACARIDOS SOBRE LA DINAMICA MOLECULAR DE PROTEINAS DE SUERO LACTEO EN SOLUCION ACUOSA

4.1.1. Materiales

En el desarrollo experimental de la presente Tesis Doctoral se utilizaron como materias primas: un concentrado proteico de suero lácteo (WPC), un aislado proteico de suero lácteo (WPI), hidrolizados de WPI a diferentes grados de hidrólisis (GH): 1,0 % (H1), 3,0 % (H2) y 5,0 % (H3), y dos muestras de polisacáridos aniónicos no superficialmente activos (PS), alginato de sodio (AS) y λ -carragenina (λ -C). Los principales componentes químicos de las materias primas se presentan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Composición centesimal de las materias primas.

Composición (%)	WPC	WPI	H1	H2	H3	AS	λ -C
Proteínas (b.s.)	76,81	92,00	88,09	88,00	85,90	–	–
Carbohidratos	–	–	–	–	–	63,00	68,00
Humedad	4,52	6,00	6,30	7,30	7,43	14,00	8,00
Grasa	8,01	0,20	–	–	–	–	–
Lactosa	9,00	0,20	–	–	–	–	–
Cenizas	2,05	1,50	4,20	4,31	5,50	23,00	24,00
Na⁺	0,20	0,50	–	–	–	9,30	2,70
K⁺	0,60	1,30	–	–	–	0,80	5,00
Ca²⁺	0,31	0,10	–	–	–	–	0,35
Mg²⁺	0,10	0,10	–	–	–	–	0,50

4.1.1.1. Proteínas de suero lácteo

La muestra comercial de WPC fue provista por Arla Food (Porteña, Cordoba,

Argentina). Este producto se comercializa bajo la forma de WPC-80 siendo producido a partir de suero dulce mediante ultrafiltración a baja temperatura y posterior secado spray. Las características fisicoquímicas del WPC fueron evaluadas en términos de su composición centesimal (Tabla 4.1), índice de solubilidad de nitrógeno (NSI) o solubilidad (según 4.1.5.1), tamaño molecular de fracciones proteicas principales (según 4.1.5.2-3), propiedades térmicas (según 4.1.5.4.) y porcentaje de proteína nativa y desnaturalizada (según 4.1.5.5). La muestra de WPC presentó un valor de índice de solubilidad de nitrógeno (NSI) del 94,26% a pH 7.

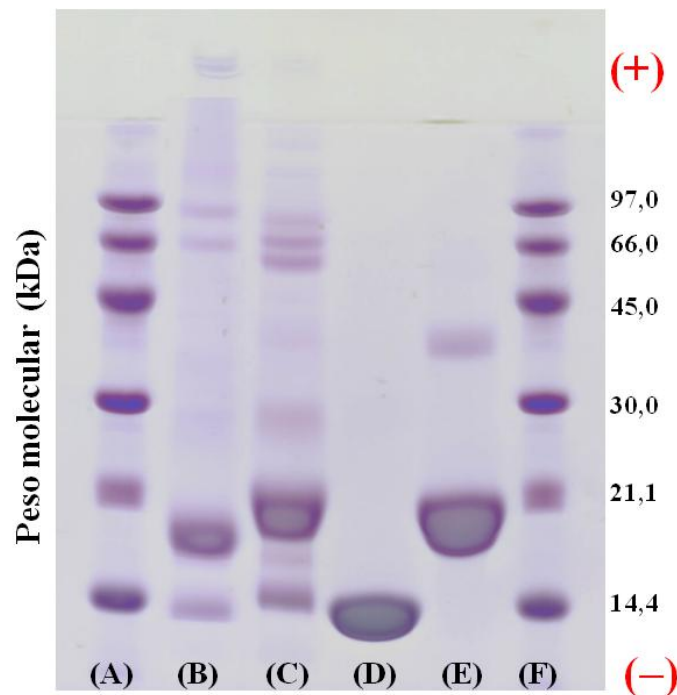


Figura 4.1. Perfil electroforético (SDS-PAGE) en condiciones no reductoras (B) y reductoras (C) de la muestra de WPC. Además se incluyen los perfiles electroforéticos de α -LA (D) y WPI (E) en condiciones no reductoras. Las calles (A) y (F) corresponden al perfil electroforético de los patrones de peso molecular: α -LA, 14,4 KDa; inhibidor de tripsina, 20,1 KDa; anhidrasa carbónica, 30 KDa; ovalbúmina, 45 KDa; BSA, 66 KDa; fosforilasa B, 97 KDa.

La Figura 4.1 muestra el perfil electroforético (SDS-PAGE) de la muestra de

WPC tanto en condiciones no reductoras (B) como reductoras (C). El análisis electroforético reveló la existencia de fracciones proteicas típicas de una preparación de WPC (Farrell y col., 2006). En condiciones no reductoras (B), las principales fracciones reveladas fueron: α -LA (14,4 KDa), β -LG (~18 KDa), BSA (66 KDa), LF (~80 KDa) y una fracción proteica menor contenida en el gel de *stacking* (parte superior del gel). En condiciones reductoras (C), las bandas pertenecientes a las principales fracciones proteicas se conservaron, y se pudo revelar la existencia de dos nuevas bandas: una banda difusa de ~30 KDa y otra de ~50 KDa. Estas bandas podrían corresponder a la cadena L y a la cadena H de IgG (fracción II de Cohn), respectivamente (Farrel y col, 2006). Además, en condiciones reductoras, se observó que la fracción menor contenida en el gel de *stacking* prácticamente desapareció. En condiciones no reductoras, la fracción contenida en el gel de *stacking* podría relacionarse con la presencia de IgG, que no pasó al gel de corrida debido a su elevado tamaño (~150 KDa) o con la presencia de agregados proteicos de WPC ensamblados por puentes disulfuro.

El cromatograma (SEC-HPLC) de la muestra de WPC a pH 7 y fuerza iónica 0,05 M se presenta en la Figura 4.2. Los resultados de SE-HPLC fueron consistentes con los resultados de SDS-PAGE presentados en la Figura 4.1. A bajos tiempos de elución, el cromatograma reveló la existencia de agregados proteicos de alto peso molecular (~578 KDa), mientras que a elevados tiempos de elución, el cromatograma presentó dos picos de elevada absorbancia, los que correspondieron a la forma dimérica de β -LG y a la presencia de α -LA (Figura 4.2). La existencia de agregados proteicos en la muestra de WPC podría vincularse con la desnaturalización térmica que normalmente sufren estas preparaciones comerciales como consecuencia del secado spray durante su proceso de obtención (Mangino y col., 1987; Hurley y col. 1990; Wang y col. 2003).

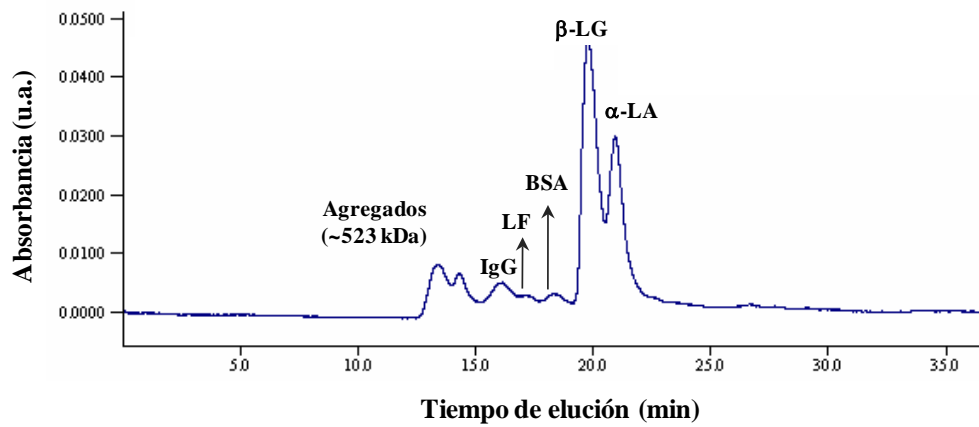


Figura 4.2. Cromatograma (SEC-HPLC) de la muestra de WPC a pH 7 y fuerza iónica 0,05 M.

Por otro lado, el análisis térmico (DSC) de la muestra de WPC reveló la presencia de un pico endotérmico ($\Delta H = 6,60 \pm 0,15 \text{ J.g}^{-1}$) a $75,20 \text{ }^\circ\text{C}$ (temperatura de desnaturalización, T_d), y una temperatura de onset (T_{onset}) de $61,70 \pm 0,05 \text{ }^\circ\text{C}$. Estas transiciones térmicas se encontraron similares a las reportados por [de Wit y col. \(1988\)](#) y [Spahn y col. \(2007\)](#) para otras muestras comerciales de WPC y, en general, sugieren la presencia de una significativa cantidad de proteína nativa en la muestra de WPC bajo estudio. Los análisis del porcentaje de proteína nativa y desnaturalizada de la muestra de WPC arrojaron los siguientes valores: 84,0% de proteína nativa y 16,0% de proteína desnaturalizada.

La muestra de WPI se obtuvo de Danisco Ingredients (Dinamarca). De acuerdo a las especificaciones del fabricante esta muestra contuvo: $\beta\text{-LG} > 95\%$, $\alpha\text{-LA} < 5\%$. Las características fisicoquímicas del WPI fueron evaluadas en términos de su composición centesimal (Tabla 4.1), índice de solubilidad de nitrógeno (NSI) o solubilidad (según 4.1.5.1), perfil electroforético (según 4.1.5.4) y porcentaje de proteína nativa y

desnaturalizada (según 4.1.5.5). La muestra de WPI presentó un valor de índice de solubilidad de nitrógeno (NSI) de 99,70% a pH 7. El perfil electroforético reveló la existencia de un elevado contenido de β -LG en la muestra, mientras que la fracción correspondiente a α -LA no fue detectada (Figura 4.1). Los análisis del porcentaje de proteína nativa y desnaturalizada de la muestra de WPI arrojaron los siguientes valores: 99,4% de proteína nativa y 0,6% de proteína desnaturalizada.

Las muestras comerciales de WPC y WPI se usaron en este proyecto de investigación sin previa purificación.

4.1.1.2. Hidrolizados de WPI

Los hidrolizados de WPI se obtuvieron en un bioreactor enzimático de tipo discontinuo (Figura 4.3). La hidrólisis limitada se realizó utilizando α -quimiotripsina II (EC 3.4.21.1) inmovilizada sobre micropartículas de agarosa (carga de enzima: 40 mg/g soporte, actividad enzimática: 60 U/mg soporte) a pH 8,0 y a temperatura de 50 °C (condiciones óptimas de reacción enzimática).

La enzima α -quimiotripsina bovina es una proteasa de Ser que hidroliza enlaces peptídicos entre aminoácidos aromáticos o entre aminoácidos que poseen cadenas laterales hidrofóbicas (Tyr, Trp, Phe, Met, Leu) desde el extremo C-terminal de dichos enlaces peptídicos.

Se produjeron muestras de hidrolizados proteicos a tres grados de hidrólisis (GH) distintos: 1% (H1), 3% (H2) y 5% (H3). El pH y el GH se controlaron mediante el método de pH-*stat*.



Figura 4.3. Fotografía del bioreactor enzimático empleado.

Este método se fundamentó en la valoración de los protones liberados tras la ruptura de los enlaces peptídicos en un medio de reacción alcalino a pH constante. El GH se calculó a partir de los volúmenes de base adicionados para mantener el pH constante según la siguiente ecuación (Adler-Nisen, 1986):

$$GH = B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{M_p} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100\% \quad (\text{Ec. 4.1})$$

donde B es el volumen (ml) de base consumido en la reacción, N_b su normalidad, α es el grado de disociación de los grupos $\alpha\text{-NH}_2$, M_p la masa de proteína que es hidrolizada, y h_{tot} el número total de uniones peptídicas en el sustrato proteico y está dado en meq de uniones peptídicas por gramo de proteína. El grado de disociación de grupos $\alpha\text{-NH}_2$, α , fue calculado según:

$$\alpha = \frac{10^{(pH-pK)}}{1+10^{(pH-pK)}} \quad (\text{Ec. 4.2})$$

donde pK es el valor de disociación promedio para los grupos $\alpha\text{-NH}_2$ liberados durante la hidrólisis y es dependiente de la temperatura, longitud de cadena de los péptidos y de la naturaleza del aminoácido terminal. A 50 °C (temperatura de hidrólisis utilizada en este trabajo) el valor promedio de pK fue 7,1 (Adler-Nissen, 1986). A pH 8,0 (valor de pH para todas las reacciones de hidrólisis ensayadas) el valor calculado de α fue 0,96. El valor de h_{tot} para el WPI fue 8,8 meq.g⁻¹ (Adler-Nissen, 1986). El pH del medio de reacción (pH 8,0) se controló por adición de volúmenes adecuados de una solución de NaOH 2,0 N. Posterior al agregado de la enzima inmovilizada, se adicionaron los volúmenes necesarios de base para mantener el pH constante a partir de una microbureta mecánica Metrohm E485. Se registraron los volúmenes de NaOH adicionados en función del tiempo. Alcanzado el GH deseado, las dispersiones de proteínas hidrolizadas se retiraron del reactor y posteriormente se filtraron al vacío con el fin de recuperar las micropartículas conteniendo la enzima inmovilizada. Por último, dichas dispersiones se liofilizaron en un equipo Heto FD 25 (Heto-Holten, Dinamarca).

La exactitud de los valores de GH obtenidos por el método de pH-*stat* depende del tipo de actividad de la enzima utilizada en la reacción de hidrólisis (Adler-Nissen, 1986). Dada la actividad endopeptidasa de la α -quimiotripsina bovina y el bajo rango (limitado) de GH empleado en esta investigación (1-5 %), los valores de GH obtenidos no requerirían comprobación por técnicas analíticas adicionales (Spellman y col., 2003).

Las características fisicoquímicas de los hidrolizados de WPI fueron evaluadas en términos de su composición centesimal (Tabla 4.1) y perfil electroforético (según

4.1.5.2). El aumento en el contenido de cenizas y humedad de los hidrolizados con el incremento del GH podrían vincularse con la metodología de pH-*stat*. El avance de la reacción enzimática hasta el mayor GH evaluado requirió la adición de volúmenes crecientes de NaOH 2N, de allí el incremento en los porcentajes de cenizas y humedad observados.

La Figura 4.4 muestra el perfil electroforético (SDS-PAGE) de los hidrolizados de WPI en condiciones no reductoras. La hidrólisis enzimática modificó el perfil electroforético del WPI.

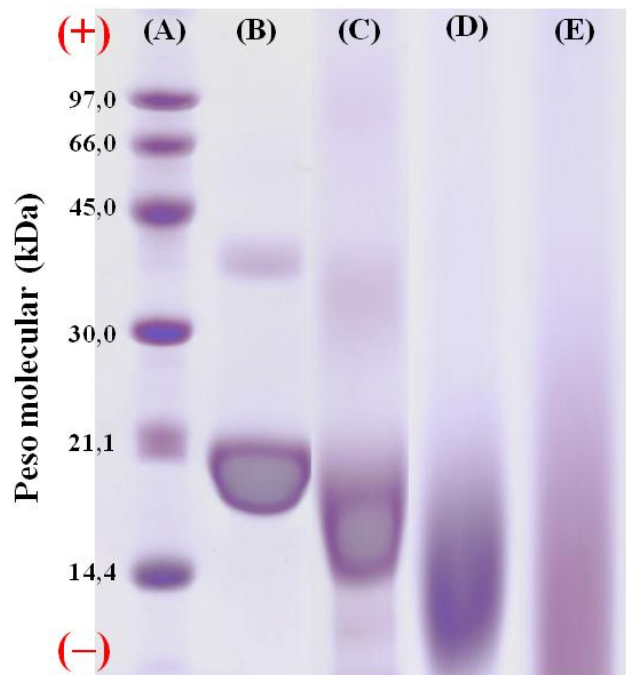


Figura 4.4. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el perfil electroforético (SDS-PAGE) en condiciones no reductoras de la muestra de WPI. La calle B corresponde al WPI sin hidrolizar (GH = 0,0 %), la calle C a H1 (GH = 1,0 %), la calle D a H2 (GH = 3,0 %) y la calle D a H3 (GH = 5,0 %). La calle (A) corresponde al perfil electroforético de los patrones de peso molecular: α -LA, 14,4 KDa; inhibidor de tripsina, 20,1 KDa; anhidrasa carbónica, 30 KDa; ovalbúmina, 45 KDa; BSA, 66 KDa; fosforilasa B, 97 KDa.

El aumento del GH de 1,0-5,0 % provocó un desplazamiento de la banda de β -LG (calle B) hacia regiones de bajos pesos moleculares (calles C-D) confirmando la reducción del tamaño molecular de la proteína como consecuencia del tratamiento enzimático aplicado.

4.1.1.3. Polisacáridos

Las muestras de AS y λ -C fueron obtenidas de Cargill (Buenos Aires, Argentina). La composición centesimal de estas muestras de PS se presenta en la Tabla 4.1. Los pesos moleculares de AS y λ -C (datos suministrados por el fabricante) fueron: 135 y 1.000 KDa, respectivamente. Una caracterización fisicoquímica adicional, suministrada por el fabricante, incluyó la viscosidad de dispersiones acuosas de ambos PS determinada en un viscosímetro Brookfield RVT a 20 rpm y a temperatura de 20 °C. Los valores de viscosidad para las dispersiones de AS y λ -C al 1,0 %p/p fueron 45 ± 15 cps y 365 ± 35 cps, respectivamente.

4.1.2. Técnicas de caracterización

4.1.2.1. Solubilidad

La solubilidad en medio acuoso se determinó como el índice de solubilidad de nitrógeno (NSI) mediante un método estandarizado (AACC, 1983) y utilizando un factor de corrección para proteínas lácteas ($N \times 6,38$). Las medidas de NSI se obtuvieron por triplicado.

4.1.2.2. Calorimetría diferencial de barrido

Para la determinación de las propiedades térmicas se utilizó calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se obtuvieron la temperatura de pico (T_d) y la diferencia de entalpía (ΔH) involucrada en el proceso de desnaturalización térmica. Para ello, se utilizó un calorímetro diferencial de barrido Mettler Toledo modelo DSC821e (Schwerzenbach, Suiza). El instrumento se calibró con indio (156,6 °C), plomo (327,5 °C) y zinc (419,6 °C). Los parámetros térmicos se obtuvieron a partir del calentamiento de 60 μ l de muestra (a una determinada concentración) dispuestos en cápsulas de 160 μ l de capacidad desde 5 a 100 °C a velocidad de 10 °C/min. Se usó una cápsula vacía como referencia. Las determinaciones calorimétricas se realizaron por triplicado.

4.1.2.3. Cromatografía líquida de alta presión

Se determinó la distribución de tamaños de fracciones proteicas mediante cromatografía líquida de alta presión acoplada a cromatografía de exclusión de tamaño (SEC-HPLC) a pH 7,0 y fuerza iónica 0,05 M. Para ello, se utilizó un cromatógrafo modelo 9012 equipado con un detector UV/Vis (Varian, CA, USA) y con una columna Biosep SEC S2000 (5 μ m de rango de exclusión). La fase móvil se evaluó a 280 nm. Se construyó una curva de calibración utilizando un kit comercial de proteínas de peso molecular (KDa) conocido: 670 (tiroglobulina bovina), 158 (γ -globulina bovina), 44 (ovalbúmina de pollo), 17 (mioglobina de caballo) y 1, 35 (vitamina B-12). Se dispersó la proteína en fase móvil a una concentración de 0,05 %p/p y posteriormente se filtró con una membrana de acetato de celulosa cuyo tamaño de poro fue de 0,45 μ m.

4.1.2.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida

El perfil electroforético de las proteínas se determinó cualitativamente a través de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) de acuerdo al método desarrollado por Laemmli (1970) con algunas modificaciones. Mediante esta técnica, las distintas fracciones proteicas acomplejadas con el SDS, migran a través de las mallas del gel de poliacrilamida con una velocidad que es función de su masa y no de su carga total. Para este análisis se empleó una cuba electroforética modelo Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories California E.E.U.U.), para geles en placa de 7 cm de largo por 8 cm de ancho, con un espesor variable entre 0,5 y 1,5 mm, provista de una fuente de poder Model 1000/500 de la misma firma, que permite suministrar el voltaje constante.

Consecuentemente, se adoptó el sistema de gel discontinuo, constituido por un gel de apilamiento, de poro grueso o *stacking* (localizado en la parte superior) y un gel de separación o de poro fino, cuyas concentraciones de acrilamida fueron 4 % y 13 % respectivamente. Ambos geles fueron preparados mezclando soluciones stock de acrilamida y los buffers de corrida y apilamiento (los dos con SDS), en las proporciones adecuadas para lograr las concentraciones indicadas. En todos los casos, se trabajó con geles de 1 mm de espesor. Las experiencias se desarrollaron en medio alcalino, usando el buffer de corrida tris-glicina a pH 8,3.

Las muestras se disolvieron por partes iguales en el buffer de muestra contiendo SDS, 5% de β -mercaptoetanol (solo cuando se requirieron condiciones reductoras), y una punta de espátula de azul de bromofenol como indicador del frente de avance. La mezcla resultante, que contuvo aproximadamente 3 mg de proteína por ml de solución,

fue tratada durante 5 min a 95°C para permitir la fijación del SDS. En base a experiencias previas, se adoptó una siembra de 7 µl por calle, en virtud de que esta cantidad proporcionó la mejor resolución. En los ensayos electroforéticos fueron incluidos: α-LA de Sigma Chemical Company (S.t. Louis, M.O. U.S.A.) y marcadores de peso molecular: α-LA, 14,4 KDa; inhibidor de tripsina, 20,1 KDa; anhidrasa carbónica, 30 KDa; ovalbúmina, 45 KDa; BSA, 66 KDa; fosforilasa B, 97 KDa (LMW Kit, VWR International, U.S.A.).

Las condiciones de corrida en todos los casos fueron las siguientes: voltaje constante, 150 Volt; intensidad máxima, 45 mA y potencia, 6,75 Watt. La finalización de la corrida fue determinada por la llegada del frente de avance (azul de bromofenol) al final de la placa.

La tinción de los geles se realizó colocándolos en Coomassie Brilliant Blue R - 250, en presencia de etanol y ácido acético durante una hora, y el exceso de colorante fue eluído mediante sucesivos lavados con una solución decolorante constituida por ácido acético, etanol y agua.

4.1.2.5. Porcentaje de proteína nativa y desnaturalizada

El porcentaje de proteína desnaturalizada en las muestras se determinó de acuerdo al método descrito por [de Wit y col. \(1988\)](#) con algunas modificaciones. Se tomó una alícuota de proteínas de suero lácteo al 10,0 %p/p y el pH se ajustó a un valor de 4,6 ± 0,1 con HCl 2,0 N para generar la precipitación isoeléctrica de las proteínas. Posteriormente, distintas alícuotas se centrifugaron a 26.000g en una centrífuga Biofuge 28RS (Alemania) por 30 min a 5 °C y el contenido de nitrógeno se determinó en el

sobrenadante por el método de Kjeldhal usando un factor de corrección para proteínas lácteas ($N \times 6,38$). Se calculó el porcentaje de proteína nativa como la diferencia entre la concentración de proteína en la muestra original y la concentración de proteína en el sobrenadante luego de la precipitación a pH 4,6 (Morr, 1990). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

4.1.3. Determinación de las interacciones macromoleculares

El estudio de las interacciones macromoleculares entre proteínas y PS en solución acuosa (a pH neutro y baja fuerza iónica) comprendió la aplicación de varias técnicas analíticas complementarias.

4.1.3.1. Preparación de dispersiones

Las proteínas y los PS se dispersaron en una solución reguladora comercial llamada trizma: $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{-C-NH}_2/(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{-C-NH}_3\text{Cl}$ (Sigma, USA). Dicha solución reguladora se preparó con agua ultrapura siendo su pH y fuerza iónica, 7 y 0,05 M, respectivamente. Las dispersiones de PS se agitaron por 30 min a temperatura de 80 °C para facilitar la dispersión del biopolímero y luego las mismas se conservaron hasta el otro día a temperatura de 4-5 °C para permitir su hidratación completa.

4.1.3.2. Preparación de los sistemas mixtos

Los sistemas mixtos proteína-polisacárido se obtuvieron mezclando volúmenes

apropiados de concentración de biopolímeros al doble de la requerida para alcanzar la concentración final en los sistemas bajo estudio. La concentración de proteínas en los sistemas mixtos se mantuvo constante en 1,0 %p/p (a menos que se indique otra concentración). Se analizó el efecto de los PS sobre la magnitud de las interacciones macromoleculares en el rango de concentración de 0,0-1,0 %p/p (a menos que se indique otro rango de concentración). Las dispersiones acuosas de los sistemas bajo estudio se agitaron por 30 min a temperatura ambiente antes de ser ensayadas.

4.1.3.3. Espectroscopía de fluorescencia

Los estudios de fluorescencia tanto intrínseca como extrínseca de los sistemas bajo estudio se realizaron en un espectrofluorómetro F2000 (Hitachi, Japón) equipado con una cubeta de cuarzo de 1,0 cm de espesor.

Espectroscopía de fluorescencia intrínseca

Para las mediciones de fluorescencia intrínseca del triptófano (Trp), la longitud de onda de excitación fue de 295 nm (Albani, 2004). Se obtuvieron los espectros de emisión en el rango de 310-450 nm y se restó el blanco correspondiente a la solución reguladora trizma para corregir cualquier interferencia.

Espectroscopía de fluorescencia extrínseca

Las mediciones de fluorescencia extrínseca se realizaron usando la sonda

fluorescente ácido 1-anilino-8-naftalen sulfónico (ANS, Fluka Chemie AG, Suiza) de acuerdo al método descrito por [Kato y Nakai \(1980\)](#), con algunas modificaciones. Se obtuvieron diluciones seriadas en solución reguladora trizma a partir de los sistemas bajo estudio en el rango de concentración de 0,01-0,05 mg/ml. Luego, se añadieron 10 µl de ANS (8 mM) a 2 ml de cada una de las diluciones y la intensidad de fluorescencia (IF) se midió a 350 nm (excitación) y 470 nm (emisión). A partir de la curva de IF (en unidades arbitrarias, u.a.) versus concentración (mg/ml) se calculó la pendiente inicial por ajuste de modelo de regresión lineal a los datos experimentales. El valor de dicha pendiente fue usado como un índice de la hidrofobicidad superficial (S_0). Las mediciones de fluorescencia intrínseca y extrínseca se realizaron por triplicado.

4.1.3.4. Espectroscopía de absorción UV/Vis

Se utilizó espectroscopía de absorción UV/Vis en presencia de azul de metileno (AM) para determinar la existencia de interacciones electrostáticas atractivas en los sistemas mixtos de acuerdo al método desarrollado por [Michon y col. \(2000\)](#).

Normalmente las soluciones acuosas de AM presentan un máximo de densidad óptica (DO) a 664 nm. Cuando polisacáridos aniónicos son añadidos a soluciones acuosas de AM, el pico a 664 nm decrece y se observa un corrimiento del pico hacia bajas longitudes de onda. Este cambio en las propiedades de absorción son atribuidas a la existencia de interacciones atractivas entre las moléculas de AM (con carga positiva a pH neutro) y los polisacáridos aniónicos para formar complejos metacromáticos solubles ([Soedjak, 1994](#)) (Figura 4.5). Si se añade una proteína al sistema metacromático, esta podría interactuar con el polisacárido aniónico a través de sus

patches positivos, y algunas moléculas de colorante podrían removerse de la superficie del complejo metacromático liberándose en la fase acuosa. Así, la intensidad del pico a 664 nm aumenta y el corrimiento a bajas longitudes de onda decrece.

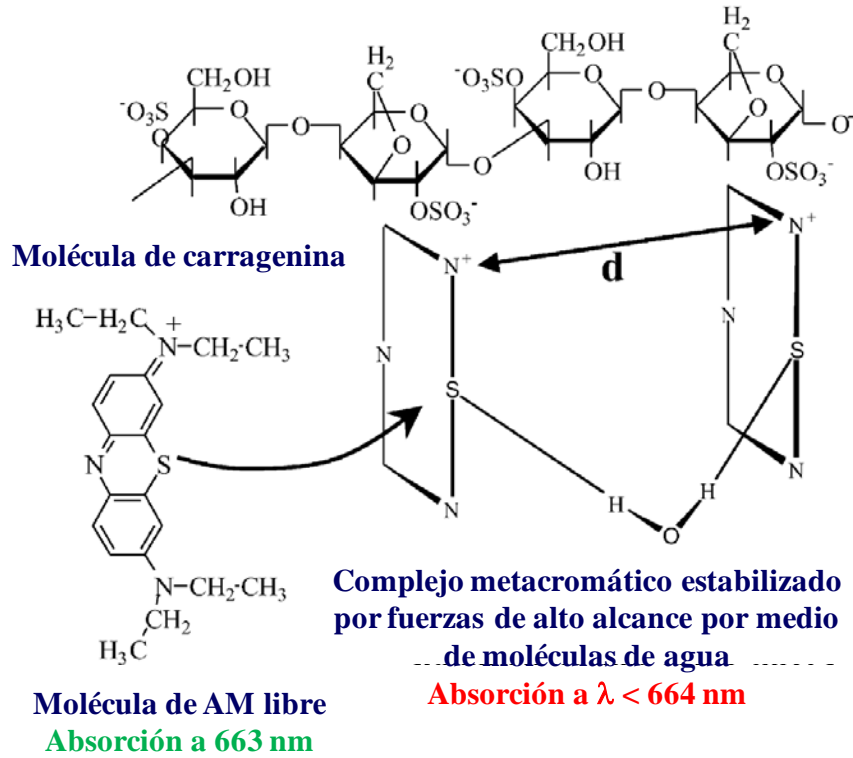


Figura 4.5. Representación esquemática de las interacciones entre azul de metileno y carragenina.

Para este ensayo, se preparó una solución de AM (Merck, Alemania) a una concentración de 0,001 %p/p disolviendo la cantidad apropiada de colorante en solución reguladora trizma. Las muestras de proteínas y PS se dispersaron en esta solución de colorante y se prepararon los sistemas mixtos, como se ha detallado previamente (sección 4.1.5.2). La magnitud de las interacciones atractivas en los sistemas mixtos se analizó en diferentes ensayos competitivos dentro del rango de concentración de biopolímeros de 0,0-1,0 %p/p. Las mediciones de DO se realizaron con un

espectrofotómetro Lambda-20 (Perkin-Elmer, USA) por triplicado.

4.1.3.5. Microscopía de fluorescencia confocal

La ultraestructura de los sistemas mixtos se analizó por microscopía de fluorescencia confocal (MFC) usando un microscopio invertido Nikon TE2000E (Japón) equipado con un sistema confocal de tipo Nikon C1siR. La MFC se realizó combinando los modos de epifluorescencia y de contraste diferencial interferencial. Para las observaciones de ultraestructura, las proteínas se marcaron con la sonda fluorescente ANS (Fluka Chemie AG, Suiza). La excitación de los sistemas bajo estudio se realizó usando un láser UV a 374 nm y la emisión se registró entre los 415-485 nm. Las alícuotas de los sistemas bajo estudio se colocaron entre porta y cubre objeto y se examinaron a 40 x. En algunos casos, las observaciones se realizaron a 200 x.

4.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS POLISACARIDOS SOBRE LA ADSORCION INTERFACIAL DE PROTEINAS DE SUERO LACTEO

4.2.1. Presión superficial en el equilibrio

Previo al estudio del proceso de adsorción interfacial de proteínas en presencia de PS se determinó la concentración de saturación de la interfase aire-agua y la actividad superficial de las proteínas. Las medidas de tensión superficial en el equilibrio de las películas adsorbidas se realizaron a pH 7 y fuerza iónica 0,05M, de acuerdo al método de la placa de Wilhelmy utilizando un tensiómetro automático Sigma 701 (KSV,

Finlandia) equipado con una placa de platino rectangular.

4.2.1.1. Descripción del dispositivo experimental y principio de funcionamiento

El tensiómetro automático Sigma 701 consta de un recipiente o cápsula que contiene el líquido que se analiza y una placa de platino que se adjunta a un dispositivo sensible de medición de fuerza. El recipiente que contiene la muestra bajo estudio es capaz de moverse hacia arriba o hacia abajo, mientras que la placa permanece inmóvil. El recipiente se coloca de modo que el líquido sólo entra en contacto con la placa, i.e., el borde inferior de la placa es paralelo a la superficie del líquido (Figura 4.6).

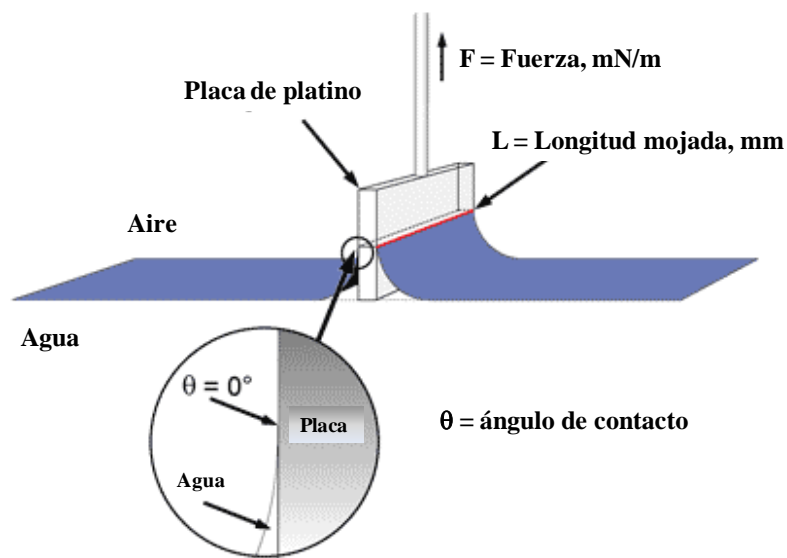


Figura 4.6. Representación esquemática del método de la placa de Wilhelmy para la determinación de la presión superficial de películas de proteína adsorbidas sobre la interfase aire-agua.

Cuando un cuerpo sólido se pone en contacto con la interfase, la tensión

interfacial actúa a lo largo de la línea de mojado. En este tipo de tensiómetro se utiliza como sistema de medida una lámina de platino rectangular, suspendida verticalmente, con una geometría exactamente conocida. El borde inferior de la lámina se pone en contacto con el líquido y de ese modo se moja, i.e., el líquido se mueve hacia arriba. La cantidad de líquido que se mueve hacia arriba en la placa depende de su tensión superficial y densidad. La fuerza F con que es empujada la lámina mojada hacia el líquido puede medirse como se muestra en la Figura 4.5. Si L_b es la longitud mojada, entonces la tensión superficial (σ) se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$\sigma = \frac{F}{L_b \cos \Phi} \quad (\text{Ec. 4.3})$$

donde Φ es el ángulo de contacto; i.e., el ángulo entre la superficie de la lámina y la tangente a la línea de mojado. Para medir tensiones interfaciales, la placa debe ser mojada completamente por la muestra bajo estudio contenida en la cápsula de medición. La longitud mojada de la placa de platino está determinada por, $L_b = 2 \times (l + b)$, donde l , es el largo de la placa y b , su espesor. En este caso, las dimensiones de la placa son: $l = 19,9$ mm y $b = 0,1$ mm, por lo que $L_b = 40$ mm. Normalmente, las placas que se utilizan son construidas con materiales que dan un θ cercano a cero, e.g., platino o platino-iridio.

4.2.1.2. Procedimiento experimental

Las isotermas se construyeron midiendo la tensión superficial de las películas adsorbidas en un rango de concentración comprendido entre $1,0 \cdot 10^{-6}$ -2,0 % p/p. Se

asumió la condición de equilibrio de las películas de proteínas a las 24 horas posteriores a la preparación de las dispersiones acuosas (Rodríguez Niño y col., 2001). En estos experimentos, la temperatura del sistema de medición se mantuvo constante en $20 \pm 0,5$ °C por medio de un termostato de tipo Heto. Se registró la tensión superficial, σ , a través de un dispositivo conectado al tensiómetro.

La presión superficial de equilibrio se definió como, $\pi_{eq} = \sigma_0 - \sigma_{eq}$, donde σ_0 y σ_{eq} son la tensión superficial de la solución reguladora trizma y la tensión superficial en el equilibrio de la película de proteína. Se comprobó la ausencia de contaminantes superficialmente activos en la solución reguladora trizma por medio de reiteradas mediciones de tensión interfacial antes de la preparación de las dispersiones bajo estudio.

La actividad superficial correspondió al valor de presión superficial de equilibrio para el cual se alcanzó el *plateau* en la isoterma de adsorción. La concentración en subfase acuosa a nivel de dicho *plateau* correspondió al valor de concentración de saturación de la interfase por parte de las proteínas. Los experimentos de presión superficial de equilibrio se realizaron por duplicado.

4.2.2. Presión superficial dinámica

El estudio del efecto de la presencia de los PS en la subfase acuosa (pH 7 y fuerza iónica 0,05M) sobre la formación de las películas de proteínas adsorbidas sobre la interfase aire-agua se realizó por medio de tensiometría dinámica. Para ello, se obtuvieron mediciones de la presión superficial en el tiempo utilizando un tensiómetro automático de gota pendiente (TRACKER, IT Concept, Longessaine, Francia).

4.2.2.1. Descripción del dispositivo experimental y principio de funcionamiento

El tensiómetro de gota pendiente permite obtener la respuesta de la tensión interfacial/superficial tras someter el área de la interfase a una deformación, llevada a cabo mediante ciclos de expansión y contracción del volumen de la gota, lo que produce la variación de la concentración interfacial del agente superficialmente activo adsorbido sobre la interfase aire-agua. Esta respuesta también describe el comportamiento reológico de la interfase.

En la unidad de medida del Tracker se pueden distinguir básicamente los siguientes compartimentos (Figura 4.7):

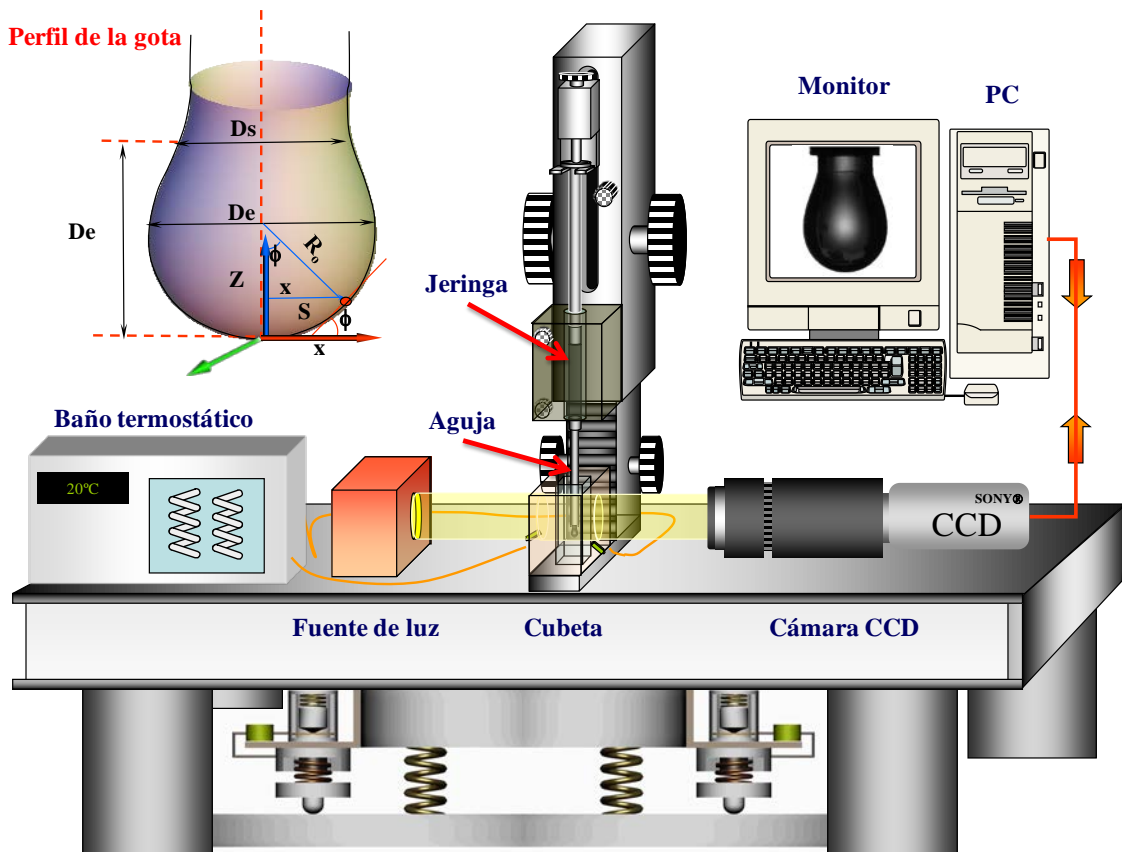


Figura 4.7. Representación esquemática del tensiómetro de gota pendiente (Tracker, IT Concept).

(i) *Dispositivo de formación de la gota:* En este compartimento se forma y controla una gota de solución bajo análisis. Consta de dos partes: la primera consiste de una jeringa acoplada a un capilar (aguja) y a un sistema de impulsión; la segunda consta de una cubeta de vidrio cubierta por un dispositivo que permite el control de la temperatura del sistema de medición. Estas dos partes están localizadas en un compartimento que permite realizar movimientos verticales y laterales en forma separada.

(ii) *Sistema óptico:* Este incluye una fuente de luz, lentes y una cámara CCD. La gota se ilumina mediante una fuente de luz uniforme, de forma que su perfil es recogido por la cámara CCD y una PC. El diseño de la unidad de medida descripto aporta una alta flexibilidad en lo que concierne a su configuración y operatividad.

Otros aspectos importantes en la medición son:

(i) *Configuración de la gota:* El tensiómetro emplea la configuración de gota pendiente. Se prefiere esta configuración cuando la densidad de la gota es mayor que la del fluido que se encuentra en el interior de la cubeta. De esta manera, la gota queda colgando del extremo de la aguja de la jeringa.

(ii) *Jeringa y aguja:* La jeringa se coloca en una cubierta, cuya temperatura se controla por medio de circulación de agua. El rango de temperatura suele oscilar normalmente entre 10 y 60 °C. Las puntas de las agujas empleadas pueden ser rectas o curvadas hacia arriba, y pueden estar recubiertas con teflón, de manera que cuando se forme la gota esta no quede adherida en el extremo de la aguja.

(iii) *Cubeta:* La cubeta es de vidrio y se introduce en una cámara cuya temperatura también se controla por medio de circulación de agua.

(iv) *Sistema óptico:* Consta de un eje óptico, una fuente de luz que proporciona una iluminación uniforme a la cubeta mediante una lámpara halógena, lentes y una cámara CCD. La luz difusa permite la visualización de la gota que se forma en el extremo del capilar, la cual es captada mediante la cámara CCD. La señal de video se transmite a un procesador-digitalizador, que graba y procesa los datos geométricos de la imagen. La PC permite la adquisición, el análisis de imagen y la realización de los cálculos necesarios.

(v) *Cámara de protección de la unidad de medida:* Posee paredes completamente oscuras y tiene la función de proteger a la unidad de medida de perturbaciones externas.

(vi) *Funcionamiento de la unidad de medida:* Las experiencias se llevaron a cabo de forma automática por la unidad de control: formación de la gota, determinación de la tensión superficial, volumen y área de la gota.

La tensión superficial dinámica, $\sigma_{(t)}$, se calculó por medio del análisis del perfil de la gota en función del tiempo de acuerdo al método descrito por [Rodríguez Niño y Rodríguez Patino \(2002\)](#). Del perfil completo de la gota se puede calcular el valor de la tensión superficial en un período de tiempo muy corto y con una gran precisión. Para determinar la tensión interfacial y el ángulo de contacto se emplea la correlación entre las coordenadas de la forma de la gota y la ecuación de Gauss-Laplace ([Anastasiadis y col., 1987](#)), tal como se describe en el Apéndice I.

4.2.2.2. Procedimiento experimental

El método consistió en la formación de una gota en el extremo de la jeringa micrométrica de vidrio tipo Hamilton de 500 μl equipada con un embolo de acero inoxidable. Posteriormente, la jeringa se colocó en el entorno de la cubeta de vidrio (5 ml) cubierta por el compartimento termostático. La temperatura de dicho compartimento se mantuvo en $20 \pm 0,2$ $^{\circ}\text{C}$ por medio de agua recirculante proveniente del baño termostático. Luego se liberó automáticamente la gota de alícuota de 5-8 μl la que permaneció colgando sobre la punta de la jeringa por un periodo de 180 min. La luz difusa permitió la visualización de la gota, formada en el extremo del capilar, por medio de la cámara CCD. La señal de video se transmitió a un procesador-digitalizador, que grabó y procesó los datos geométricos de la imagen. La computadora permitió la adquisición, el análisis de imagen y la realización de los cálculos necesarios. Los datos experimentales obtenidos mediante este método fueron reproducibles dentro de $\pm 0,2$ mN/m, y la precisión de la medida de la tensión interfacial fue de $\pm 0,1$ mN/m.

La concentración de subfase acuosa de proteínas en estos ensayos fue la concentración de saturación de la interfase aire-agua cuya determinación fue detallada en la sección 4.2.1.2. El efecto de los PS sobre la presión superficial de las películas adsorbidas de proteínas fue evaluado en el rango de 0,0-1,0 % p/p (a menos que se indique otro rango de concentración). Se chequeó la ausencia de impurezas superficialmente activas tanto en la solución reguladora trizma como en las dispersiones de PS mediante reiteradas mediciones de tensión interfacial antes de la preparación de los sistemas bajo estudio. Se observó que las dispersiones de PS presentaron una leve actividad superficial (~ 10 mN/m) probablemente debido a la existencia de trazas de contaminantes superficialmente activos. Por lo tanto, para eliminar estas impurezas, las dispersiones stock de PS fueron colocadas en placas de vidrio (tipo Petri) y fueron

succionadas (luego de las 24 hs de sus preparación) por lo menos cinco veces hasta obtener un valor bajo de presión superficial (entre 0 y 3 mN/m). Estas dispersiones de PS purificadas fueron usadas en los estudios interfaciales y de formación y estabilidad de espumas. Las medidas fueron realizadas al menos por duplicado.

4.2.3. Modelo cinético de adsorción interfacial

4.2.3.1. Etapa de difusión

Se estudió el efecto de la presencia de los PS en la subfase acuosa (pH 7 y fuerza iónica 0,05M) sobre la cinética de adsorción de las proteínas sobre la interfase aire-agua. Para ello, la cinética del proceso de adsorción interfacial (etapas de difusión, penetración y reordenamiento configuracional sobre la interfase) se determinó a través de los perfiles de presión superficial dinámica. El tiempo de adsorción comienza en el momento en que se forma la gota. La velocidad de cambio de la concentración superficial (Γ) se puede expresar como sigue (MacRitchie, 1978):

$$\left(\frac{d\Gamma}{d\theta}\right) = \left(\frac{d\Gamma}{d\pi}\right) \left(\frac{d\pi}{d\theta}\right) \quad (\text{Ec. 4.4})$$

si $(d\Gamma/d\pi)$ es constante, entonces $(d\pi/d\theta)$ puede usarse para evaluar la velocidad de adsorción de la proteína.

De acuerdo a MacRitchie (1990), a cortos tiempos de adsorción y en ausencia de convección, la etapa de difusión está conducida por un gradiente de concentración.

Durante la primera etapa, a presiones interfaciales relativamente bajas, cuando la difusión es la etapa controlante del proceso, puede emplearse una forma modificada de la ecuación de Ward y Tordai (1946) para correlacionar la variación de la presión interfacial con el tiempo de adsorción:

$$\pi = 2C_0KT \left(\frac{D\theta}{3,14} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Ec. 4.5})$$

donde, C_0 es la concentración de proteína en la subfase, K es la constante de Boltzman, T es la temperatura absoluta, y D es el coeficiente de difusión. Si la etapa de difusión hacia la interfase controla el proceso de adsorción, existe una relación lineal entre la presión superficial y la raíz cuadrada del tiempo (De Feijter y Benjamins, 1987; MacRitchie, 1990).

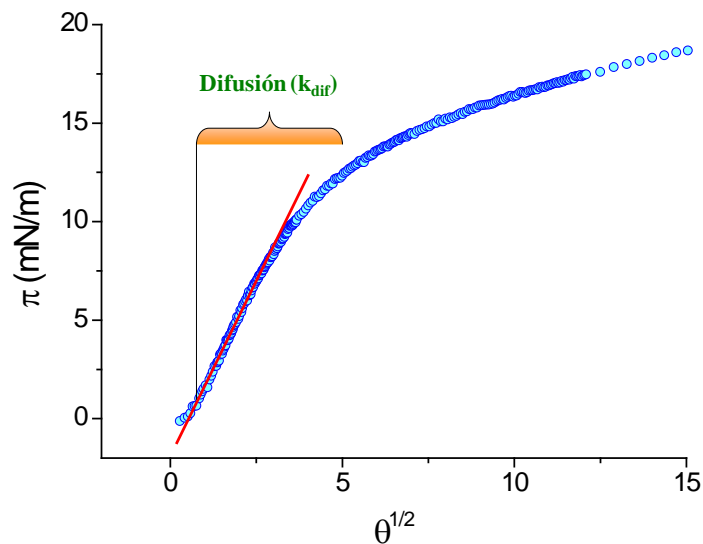


Figura 4.8. Aplicación del modelo cinético modificado por Ward y Tordai (1946) para el cálculo de la constante de velocidad de difusión de una proteína hacia la interfase aire-agua.

Verificada esta dependencia, se obtiene la constante de difusión, k_{dif} , a partir de la

pendiente de dicha gráfica mediante ajuste de los datos experimentales al modelo de regresión lineal simple (Figura 4.8).

4.2.3.2. Etapas de penetración y reordenamiento

Por otra parte, a elevados tiempos de adsorción, luego del corto periodo controlado por la etapa de difusión, existe una barrera de energía para la adsorción de las proteínas, fenómeno atribuido a las etapas de penetración, desplegamiento y reordenamiento de los segmentos adsorbidos sobre la interfase aire-agua (Rodríguez Patino y col., 1999). Para monitorear la penetración y el reordenamiento configuracional sobre la interfase se utilizó la siguiente ecuación de primer orden (Graham y Phillips, 1979; Suttiprasit y col., 1992):

$$\ln \left(\frac{\pi_f - \pi_\theta}{\pi_f - \pi_0} \right) = -k_i \theta \quad (\text{Ec. 4.6})$$

donde π_f , π_θ , y π_0 son las presiones superficiales al final de cada etapa, para algún tiempo θ , y para el tiempo de adsorción inicial, θ_0 , respectivamente; y k_i es la constante de primer orden de cada etapa de adsorción.

De acuerdo a Graham y Phillips (1979) la gráfica de la Ecuación 4.6 presenta dos regiones lineales. La pendiente inicial se toma como la constante de primer orden para la etapa de penetración (k_p), mientras que la segunda pendiente se considera como la constante de primer orden para la etapa de reordenamiento configuracional de los segmentos adsorbidos. Estas constantes de primer orden se obtienen por ajuste de los

datos experimentales al modelo de regresión lineal (Figura 4.9).

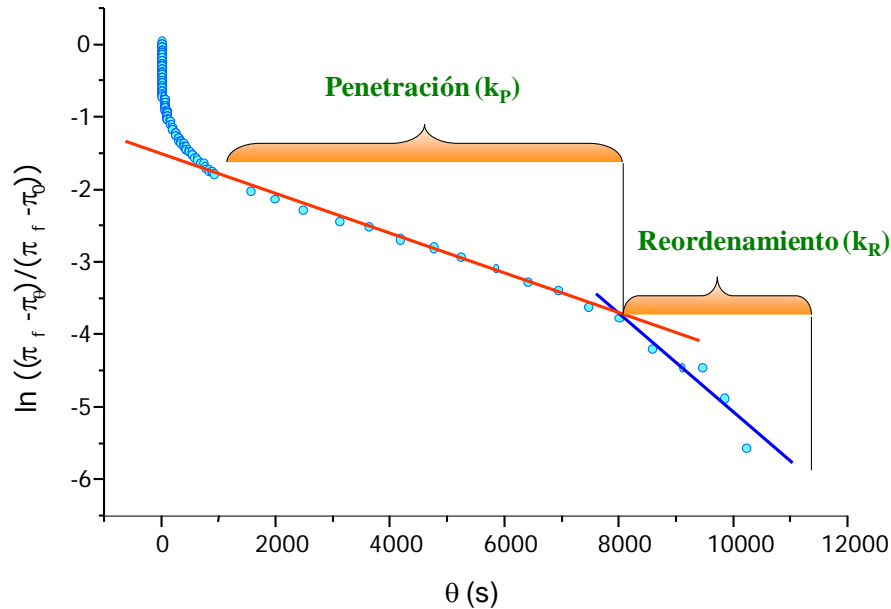


Figura 4.9. Aplicación del modelo cinético propuesto para el cálculo de las constantes de velocidad de penetración y reordenamiento de segmentos de proteína adsorbidos sobre la interfase aire-agua.

4.2.4. Reología interfacial de películas de proteínas de suero lácteo

Se estudió el efecto de la presencia de los PS en la subfase acuosa (pH 7 y fuerza iónica 0,05M) sobre las propiedades reológicas superficiales de las películas de proteínas adsorbidas sobre la interfase aire-agua. Para ello, se realizaron mediciones reológicas de las películas usando el tensiómetro dinámico de gota pendiente (TRACKER, IT Concept, Longessaine, Francia) descrito en sección 4.2.2.1. Dicho instrumento fue capaz de realizar simultáneamente medidas de tensión interfacial y de propiedades reológicas interfaciales de películas adsorbidas sobre la interfase aire-agua.

Para la obtención de las medidas reológicas interfaciales, el método consistió en la aplicación de ciclos periódicos de deformación sinusoidal y se realizó la expansión-compresión interfacial por medio del incremento-decrecimiento del volumen de la gota a una determinada amplitud ($\Delta A/A$) y frecuencia angular (ω). Se calculó el módulo dilatacional superficial (E) a partir del cambio de la tensión interfacial (σ) resultante de un pequeño cambio sinusoidal en el área superficial de la gota, A , (Lucassen y van den Tempel, 1972):

$$\sigma = \sigma_0 \text{sen}(\omega\theta + j) \quad (\text{Ec. 4.7})$$

$$A = A_0 \text{sen}(\omega\theta) \quad (\text{Ec. 4.8})$$

$$E = \frac{d\sigma}{(dA/A)} = -\frac{d\pi}{d \ln A} = |E|e^{i\phi} = E_d + iE_v \quad (\text{Ec. 4.9})$$

$$|E| = (|E_d|^2 + |E_v|^2)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Ec. 4.10})$$

donde, σ_0 y A_0 son las amplitudes del esfuerzo y de la deformación, respectivamente, ϕ es el ángulo de fase entre el esfuerzo y la deformación, π es la presión superficial y θ es el tiempo. Como puede observarse en la Ec. 4.9, el módulo dilatacional superficial se compone de una parte real y otra imaginaria. La elasticidad dilatacional de las películas, $E_d = |E| \cos \phi$, se obtuvo a partir de la parte real (componente de almacenamiento) del módulo dilatacional. La viscosidad dilatacional superficial de las películas adsorbidas, $E_v = |E| \sin \phi$, se obtuvo a partir de la parte imaginaria (componente de pérdida) del módulo dilatacional superficial. El ángulo de fase (ϕ) comprendido entre la deformación y el esfuerzo dilatacional se consideró como una medida de la viscoelasticidad relativa de las películas adsorbidas. Para un material perfectamente elástico el esfuerzo y la

deformación están en fase ($\phi = 0$) y la componente imaginaria es cero. Mientras que en el caso de un material perfectamente viscoso, ϕ es igual a 90° y la parte real es cero.

Los experimentos reológicos interfaciales se llevaron a cabo por un periodo de 180 min y a temperatura de $20 \pm 0,2$ °C. Los parámetros reológicos dilatacionales superficiales, E , E_d , E_v y ϕ se obtuvieron en función del tiempo de adsorción θ , aplicando una amplitud de deformación, $\Delta A/A = 10$ % y una frecuencia angular $\omega = 100$ mHz. Para la obtención de las medidas reológicas dilatacionales superficiales se aplicaron cinco ciclos de oscilación sinusoidal seguidos por un periodo de 50 ciclos en ausencia de oscilación. Los ensayos reológicos interfaciales se realizaron al menos por duplicado (Rodríguez Niño y Rodríguez Patino, 2002).

4.3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS POLISACARIDOS SOBRE LAS PROPIEDADES DE ESPUMADO DE PROTEINAS DE SUERO LACTEO

Se estudió el efecto de la presencia de los PS en la subfase acuosa (pH 7 y fuerza iónica 0,05M) sobre las propiedades espumantes de las proteínas. Las propiedades espumantes se evaluaron respecto a las características de formación y estabilidad de espumas. Se realizaron medidas de formación y estabilidad en un instrumento de espumado comercial (Foamsan, IT Concept, Longessaigne, Francia).

4.3.1. Descripción del dispositivo experimental y principio de funcionamiento

El dispositivo Foamsan permite la determinación de la formación y estabilidad de espumas por medio de mediciones conductimétricas y ópticas. Básicamente, consta

de las siguientes partes (Figura 4.10):

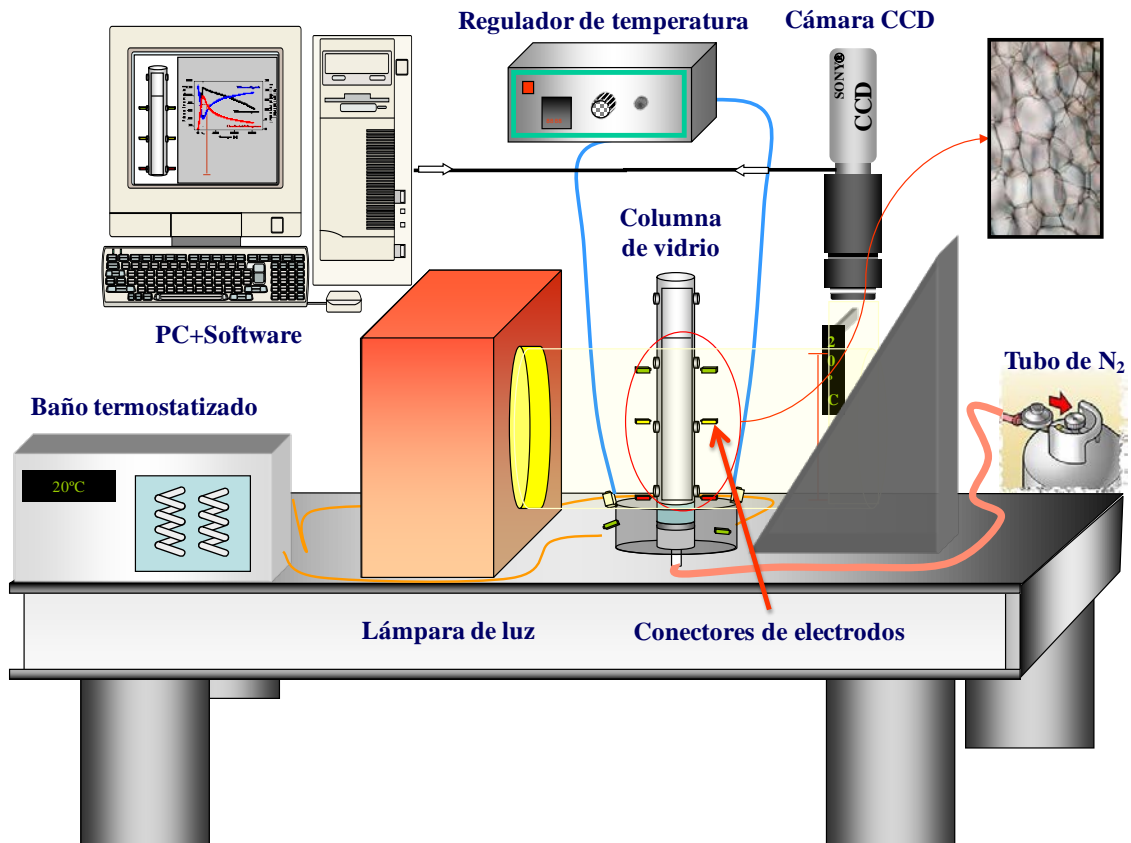


Figura 4.10. Representación esquemática del equipo de espumado (Foamscan, IT Concept).

(i) *Columna de espumas:* Es un recipiente de paredes de vidrio opaco donde se genera la espuma. El tubo de vidrio contiene dos hileras de cuatro conectores para electrodos, cada una dispuesta longitudinalmente a lo largo de dicho tubo. La columna es apoyada en una plataforma hueca de forma circular y extraíble del cuerpo de la urna. En dicha plataforma se encuentran los orificios de entrada y salida del agua de termostatización, y un orificio central en cuya base se coloca una placa porosa (diámetro de poro 0,2 μm) y donde se deposita el sistema bajo estudio. Además, en la parte inferior de dicha base se encuentra el orificio destinado a la entrada del gas y el

orificio destinado a la salida del sistema una vez que finalice la experiencia. Acoplada a la urna existe una videocámara CCD que permite visualizar el desarrollo de la espuma, ésta es la que proporciona las medidas del volumen de la espuma.

Por último, en la base existe una clavija para una conexión eléctrica responsable del control de la temperatura en el recinto donde se introduce el sistema bajo estudio. Del cuerpo de la urna salen cuatro pares de electrodos que se conectan en las conexiones previstas para ellos en el cuerpo de la columna. Estos electrodos son los encargados de la medida de la conductividad a diferentes alturas de la columna y son los encargados de medir el volumen de líquido que se incorpora a la espuma. En el fondo de la columna existe un par de electrodos usados para determinar la cantidad de líquido que no se ha incorporado a la espuma. Por lo general, la realización de estas experiencias conlleva la determinación previa de una serie de parámetros referentes a las condiciones de experimentación. Así, es necesario fijar el flujo de gas que se va a inyectar en la disolución, que debe permitir la formación de una espuma uniforme y reproducible.

(ii) *PC + Software*: El software empleado (FOAMSCAN, 2000) para el control del sistema fue adquirido de la misma empresa que diseñó y desarrolló el equipo. El equipo permite varios protocolos de trabajo según las necesidades de la investigación. Así, es posible trabajar fijando un volumen de espuma predeterminado y el equipo detendrá la inyección de gas cuando se alcance dicho volumen.

4.3.2. Procedimiento experimental

El método de espumado empleado por el equipo Foamsan es el burbujeo de gas.

Dicho método es el más empleado en investigación básica debido a la baja concentración de proteína necesaria en comparación con los otros métodos (Guillerme y col., 1993; Loisel y col., 1993). Además, es un método reproducible que proporciona burbujas de tamaño uniforme y permite un fácil monitoreo.

El estudio de formación y estabilidad de espumas mediante este método implicó la inyección de N₂ a un flujo de 45 ml/min a través de la placa porosa en el fondo de la cubeta, donde se depositó 20 ml del sistema bajo estudio (Carrera y Rodríguez Patino 2005).

En la presente Tesis Doctoral se fijó un volumen de espuma en 120 ml. Las experiencias se realizaron a temperatura de 20°C. El sistema de adquisición de datos midió el volumen de espuma que se formó en función del tiempo hasta que se alcanzó el volumen prefijado de 120 ml. A continuación se detuvo automáticamente el flujo de gas y se midió la evolución del drenaje de la espuma formada. El drenaje del líquido contenido en la espuma se monitoreó a través de medidas conductimétricas a diferentes alturas de la columna de espuma. En la Figura 4.11 se pueden observar los datos de volumen de líquido, volumen de espuma, y conductividad de la espuma durante la formación y ruptura de espumas.

Para evaluar la capacidad espumante de los sistemas bajo estudio se calcularon dos parámetros:

(i) Capacidad espumante global (OFC, “*overall foam capacity*”, ml/s) que resulta de la pendiente de la grafica de volumen de espuma versus tiempo (hasta el final del burbujeo) obtenida por ajuste de los datos experimentales al modelo de regresión lineal,

(ii) La conductividad relativa de espumas (C_f , %), como una medida de la densidad y retención de líquido de las mismas se determinó según la Ecuación 4.11:

$$C_f = \left[\frac{C_{\text{espuma}}(f)}{C_{\text{líquido}}(f)} \right] \times 100 \quad (\text{Ec. 4.11})$$

donde $C_{\text{espuma}}(f)$ y $C_{\text{líquido}}(f)$ son los valores de conductividad final de la espuma y líquido, respectivamente.

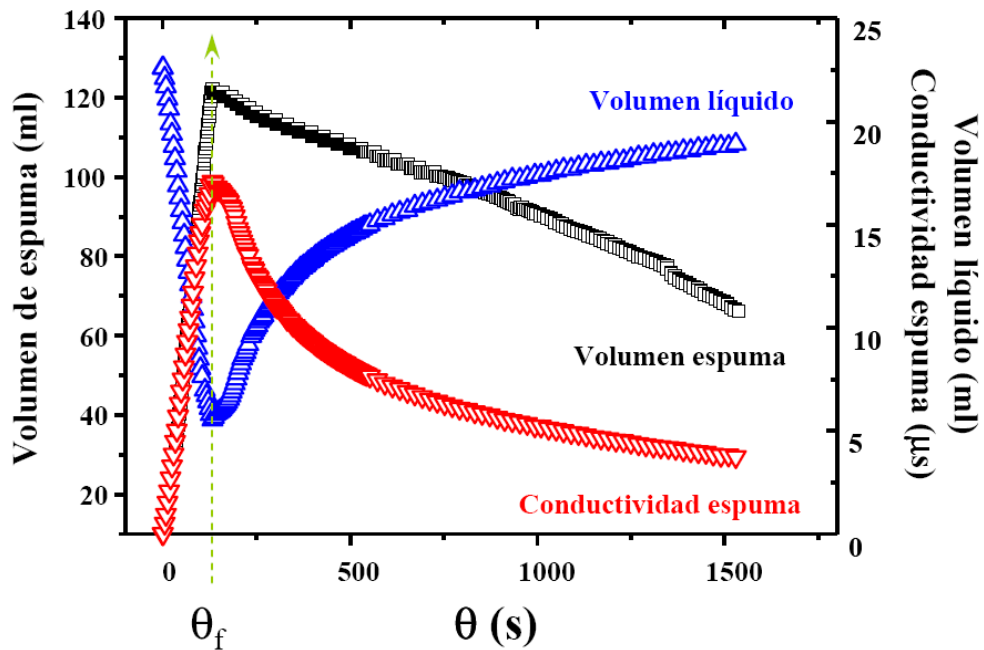


Figura 4.11. Evolución del volumen de líquido, volumen de espuma y conductividad de la espuma. En la misma también se indica el tiempo final de espumado (θ_f).

Por otro lado, se determinó la estabilidad estática de las espumas de los sistemas bajo estudio a partir del volumen de líquido drenado en el tiempo. Se utilizó el tiempo de vida media ($t_{1/2}$), referido como el tiempo necesario para drenar la mitad de líquido

contenido en las espumas, como medida de la estabilidad estática de las mismas. Además, la estabilidad se determinó por medio de la evolución en el tiempo de la conductividad de las espumas. Para ello, los datos de conductividad relativa de las espumas (C_t/C_i , donde C_t y C_i son los valores de conductividad a los tiempos $t = t$ y $t = 0$, respectivamente) versus el tiempo se ajustaron a un modelo de regresión no lineal (exponencial de segundo orden) según la Ecuación 4.12 (Kato y col., 1983; Wright y Hemmant, 1987):

$$\frac{C_t}{C_i} = A_1 e^{\left(\frac{-t}{t_d}\right)} + A_2 e^{\left(\frac{-t}{t_{dc}}\right)} \quad (\text{Ec. 4.12})$$

donde las constantes A_1 y A_2 son los parámetros ajustables y t_d y t_{dc} son los tiempos de relajación correspondientes a las cinéticas de drenaje/regeneración marginal (t_d) y desproporción/colapso de las espumas (t_{dc}), respectivamente.

Capítulo 5

RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADICION DE POLISACARIDOS SOBRE LAS PROPIEDADES INTERFACIALES Y ESPUMANTES DE PROTEINAS DE SUERO LACTEO

En la primer parte de este Capítulo se presentan los resultados obtenidos en el estudio del efecto de la adición de dos tipos de polisacáridos aniónicos no superficialmente activos (PS), tales como alginato de sodio (AS) y λ -carragenina (λ -C), sobre las propiedades interfaciales y espumantes de un concentrado de proteínas de suero lácteo industrial (WPC), a pH neutro y fuerza iónica 0,05 M. Los resultados obtenidos serán discutidos en términos de las distintas interacciones macromoleculares entre el WPC y los PS en solución acuosa (Sección 5.1.1) y del impacto de tales interacciones sobre: (i) las características superficiales, cinéticas y reológicas de películas de WPC adsorbido sobre la interfase aire-agua (Sección 5.1.2) y (ii) las características de formación y estabilidad de espumas de WPC, en relación con las características interfaciales (cinéticas y reológicas) de dicha proteína (Sección 5.1.3). Las propiedades interfaciales y espumantes del WPC puro y de los sistemas mixtos (WPC/PS) fueron comparadas con las de un aislado proteico de suero lácteo (WPI), considerado en este estudio como una referencia, fundamentalmente debido a su elevada pureza y alto contenido en β -LG nativa.

5.1.1. Efecto de la adición de polisacáridos sobre la dinámica molecular del WPC en solución acuosa

5.1.1.1. Efecto de los PS sobre la fluorescencia intrínseca del WPC

Uno de los fluoróforos intrínsecos más estudiados es el aminoácido triptófano (Trp) debido a que sus características de fluorescencia (fluorescencia intrínseca) son altamente sensibles a las condiciones del ambiente molecular de las proteínas. Por esta razón, el análisis de la fluorescencia del Trp constituye una buena herramienta para la caracterización de la dinámica molecular de proteínas en solución acuosa.

Las interacciones intermoleculares entre proteínas y otras moléculas y macromoléculas (como los polisacáridos) podrían inducir modificaciones en los parámetros de fluorescencia del Trp tales como la intensidad de emisión, rendimiento cuántico o tiempo de vida media de emisión. De esta manera, el análisis de dichas perturbaciones podría utilizarse para determinar la existencia de interacciones entre biopolímeros en solución acuosa (Albani, 2004).

La Figura 5.1 presenta el efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-1,0 %p/p) sobre la intensidad de emisión de fluorescencia intrínseca (IF_{Trp} , u.a.) de una dispersión de WPC al 1,0 %p/p. En ausencia de PS, la dispersión de WPC presentó un pico de máxima intensidad de emisión de fluorescencia a nivel de 336 nm (λ_M). Para obtener mayor información acerca del ambiente molecular de los residuos de Trp en la muestra de proteína bajo estudio, el valor de λ_M del WPC podría compararse con el obtenido para N-acetil-Trp (NAT), una variante química del Trp que reproduce el estado fisicoquímico natural en las proteínas. De la bibliografía, se tiene que el valor de λ_M para NAT es 356 nm (Kumar y col., 2005).

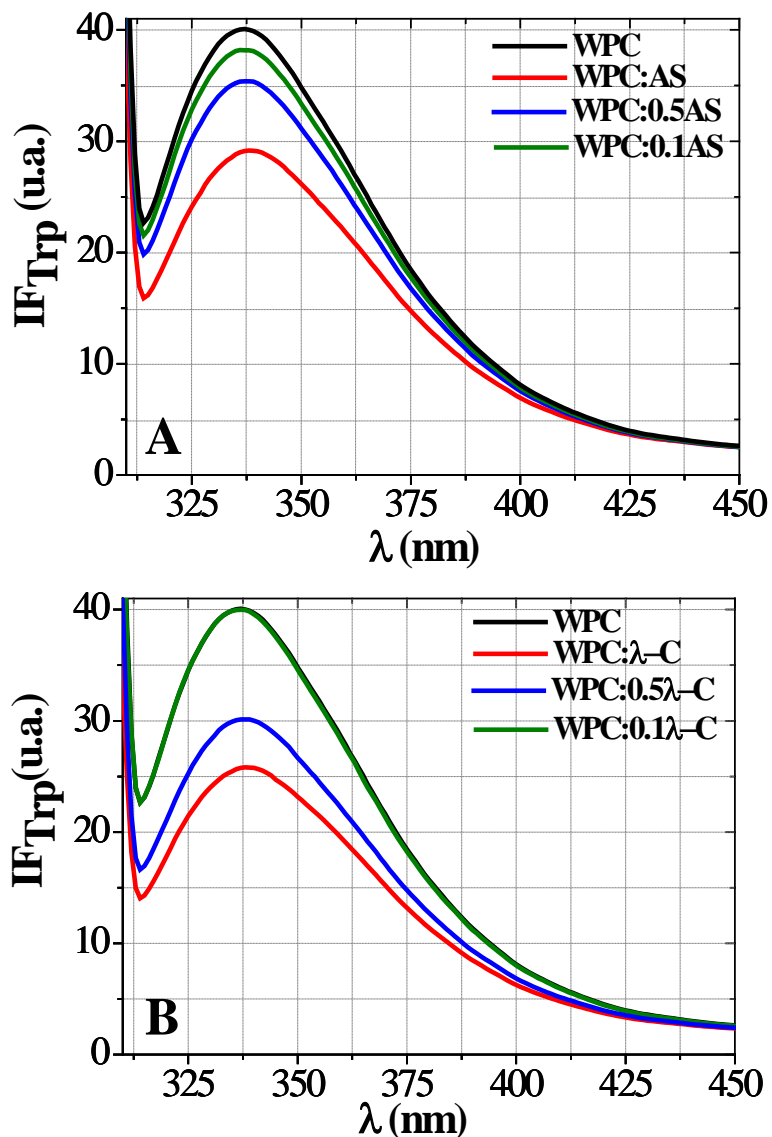


Figura 5.1. Efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-1,0 %p/p) sobre la intensidad de fluorescencia intrínseca del WPC. (A) Sistemas WPC/AS, (B) Sistemas WPC/ λ -C. Símbolos WPC:PS: 1,0:0,0 %p/p (línea negra), 1,0:0,1 %p/p (línea verde), 1,0:0,5 %p/p (línea azul), 1,0:1,0 %p/p (línea roja). Temperatura 20-23 °C, pH 7 y I 0,05 M.

A partir de esta comparación se podría deducir que la dispersión de WPC presentaría un corrimiento de λ_M hacia menores longitudes de onda o corrimiento hacia

el azul (*blue shift*). Este comportamiento podría estar asociado con la localización de residuos de Trp en un ambiente molecular hidrofóbico característico de proteínas nativas (Albani, 2004). Por lo tanto, esta técnica podría ser más sensible para la fracción nativa del WPC (84 %) debido a que se encuentra en una mayor proporción respecto de la fracción desnaturalizada o agregada (16 %) (ver sección 4.1.1.1).

Por otro lado, en presencia de los PS, se observó que el valor de λ_M del WPC no se modificó (Figura 5.1). Sin embargo, la magnitud de IF_{Trp} del WPC a nivel de λ_M disminuyó de manera gradual con el incremento de la concentración de PS. Este comportamiento sugeriría la existencia de interacciones biopoliméricas intermoleculares en la fase acuosa de los sistemas WPC/PS y que además dichas interacciones no modificarían el ambiente molecular de los residuos de Trp del WPC. La reducción de IF_{Trp} del WPC a nivel de λ_M podría vincularse con la existencia de un fenómeno de *quenching*, o apagamiento de la emisión de fluorescencia intrínseca de la proteína (Lakowicz, 1999; Albani, 2004) promovido por el incremento de la concentración de PS en los sistemas mixtos.

En general, se tienen diferentes tipos de fenómenos de *quenching*, tales como el colisional, estático, térmico y transferencia de energía a distancia, un fenómeno conocido también como transferencia de energía de Förster (Albani, 2004).

El *quenching* colisional ocurre cuando el fluoróforo y otra molécula difunden en la solución y colisionan entre sí dependiendo de su movimiento de rotación y/o flexibilidad molecular en solución. La energía absorbida por el fluoróforo es disipada en el medio por colisión con otra molécula localizada cerca de su entorno.

El *quenching* estático se observa cuando dos moléculas (fluoróforo y ligando) se unen formando un complejo no fluorescente (o fluoróforo complejado). Cuando este complejo absorbe luz, inmediatamente retorna a su estado fundamental sin emitir fluorescencia.

El *quenching* térmico es un ejemplo de transición no radiativa y se observa a nivel de cierta temperatura para la que existe una marcada disminución de la emisión de fluorescencia. Este fenómeno es debido principalmente a un incremento en el movimiento Browniano de las macromoléculas lo que facilita la disipación de la energía vibracional en el entorno acuoso como calor. De esta manera, el fluoróforo excitado es capaz de retornar al nivel de menor energía sin emitir fluorescencia.

El *quenching* por transferencia de energía a distancia o transferencia de energía de Förster ocurre entre un fluoróforo excitado (donador) y un cromóforo o un fluoróforo (aceptor). En este caso, la energía es transferida por resonancia, es decir, el electrón de la molécula excitada induce un campo eléctrico oscilante que excita los electrones del aceptor. Si el aceptor es fluorescente, su desexcitación ocurrirá por medio de emisión de fluorescencia. Sin embargo, si este no fluoresce, retornará al estado fundamental como resultado de su interacción con el solvente acuoso.

De los mecanismos de *quenching* descritos, el *quenching* colisional podría ser responsable de la reducción de IF_{TP} del WPC con el aumento de la concentración relativa de PS. Esta hipótesis se fundamenta en el hecho de que los PS evaluados no son fluorescentes y, además, los ensayos de fluorescencia intrínseca se han realizado a temperatura ambiente constante (20-23 °C), lo que podría descartar la participación de mecanismos de *quenching* estático, térmico y/o por transferencia de energía de Förster.

En virtud de la hipótesis planteada, la magnitud del fenómeno de *quenching* colisional en los sistemas WPC/PS podría evaluarse por medio de la ecuación de Stern-Volmer (Lakowicz, 1999; Albani, 2004):

$$\frac{IF_0}{IF} = 1 + k_{SV}[PS] \quad (\text{Ec. 5.1})$$

donde IF_0 corresponde al valor máximo de intensidad de fluorescencia del WPC e IF es el valor máximo de intensidad de fluorescencia del WPC en presencia de PS y k_{SV} es la pendiente de la gráfica de Stern-Volmer la que podría considerarse como un índice del efecto de *quenching* colisional sobre la fluorescencia intrínseca del WPC debido a la presencia de PS en la solución acuosa.

La aplicación de la Ecuación 5.1 se presenta en la Figura 5.2. Se observó que λ -C produjo un efecto de *quenching* colisional de mayor magnitud comparado con el producido por AS, dado que el valor de k_{SV} para los sistemas WPC/ λ -C ($0,589 \text{ \%p/p}^{-1}$) fue superior al valor de k_{SV} para los sistemas WPC/AS ($0,362 \text{ \%p/p}^{-1}$). A partir de los resultados obtenidos, podría deducirse que la disminución en la magnitud de IF_{TTP} del WPC dependería fuertemente del tipo de PS, siendo mayor el efecto en presencia de λ -C. Sin embargo, los resultados obtenidos por esta técnica brindarían sólo información sobre diferencias en el comportamiento de interacción de los sistemas WPC/PS pero no acerca de su naturaleza. Así, el fenómeno de *quenching* observado podría ser interpretado solamente en términos de la existencia de colisiones macromoleculares de tipo proteína-proteína y/o proteína-polisacárido.

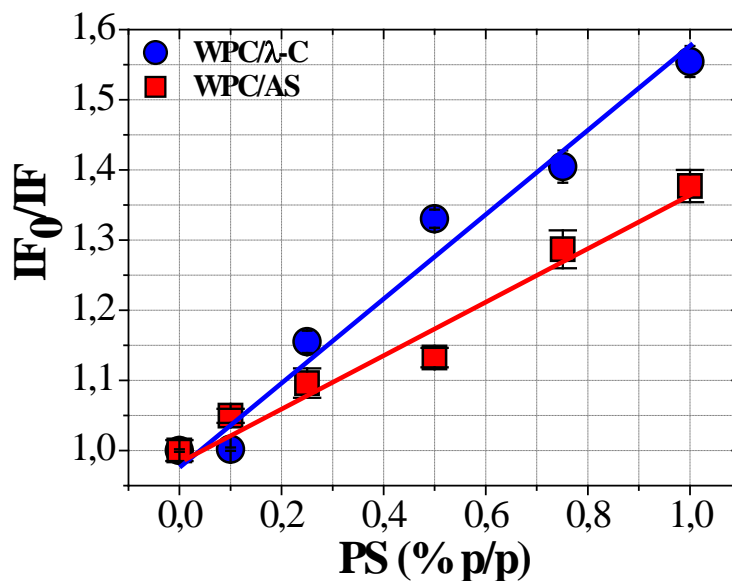


Figura 5.2. Gráficas de Stern-Volmer para los sistemas WPC/PS. Concentración de WPC 1,0 %p/p, pH 7 y I 0,05 M. Los coeficientes de correlación (R) para los sistemas WPC/λ-C y WPC/AS fueron 0,9886 y 0,9841, respectivamente.

La determinación de la naturaleza de estas interacciones por espectroscopía de fluorescencia intrínseca requiere abordar estudios a distintas temperaturas y/o diferentes condiciones del medio acuoso (Lakowicz, 1999; Hu y col., 2005). Además, como se ha mencionado previamente la aplicación de esta técnica podría ser más sensible a la fracción nativa del WPC debido a que se encuentra en una mayor proporción respecto de la fracción desnaturalizada o agregada. Como se discutirá más adelante, la fracción desnaturalizada del WPC podría intervenir en el comportamiento de interacción global de los sistemas WPC/PS.

5.1.1.2. Efecto de los PS sobre la fluorescencia extrínseca del WPC

El estudio del efecto de los PS sobre la fluorescencia extrínseca del WPC se realizó utilizando el marcador o sonda fluorescente ANS. Este marcador interacciona de manera no covalente con la proteína, fundamentalmente, a nivel de sus sitios hidrofóbicos superficiales (Penzer, 1972; Kato y Nakai, 1980). Como la muestra de WPC posee dos fracciones con diferente grado de agregación (una fracción nativa y otra desnaturalizada) sería muy probable que ambas fracciones contribuyan a la fluorescencia extrínseca global del WPC. Por lo tanto, en presencia de PS, posiblemente, esta técnica brinde información acerca de un comportamiento de interacción promedio entre ambos tipos de fracciones.

El efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-1,0 %p/p) sobre la fluorescencia extrínseca del WPC fue evaluado en términos de la hidrofobicidad superficial de la proteína (S_0), tal como se presenta en la Figura 5.3. Se observó que la magnitud de S_0 dependió del tipo de PS y de su concentración en solución indicando la existencia de diferentes interacciones macromoleculares entre los biopolímeros. Se observó que el aumento de la concentración de AS provocó primero una disminución (a nivel 0,1-0,5 %p/p) y luego un aumento del valor de S_0 (a nivel de 1,0 %p/p); mientras que el incremento de la concentración de λ -C provocó una disminución gradual del valor de S_0 del WPC.

Considerando que la adición de ANS se realizó luego de obtener los sistemas mixtos, en virtud de los resultados obtenidos, cabría suponer que los PS podrían provocar un cambio en la capacidad de interacción del WPC con el ANS.

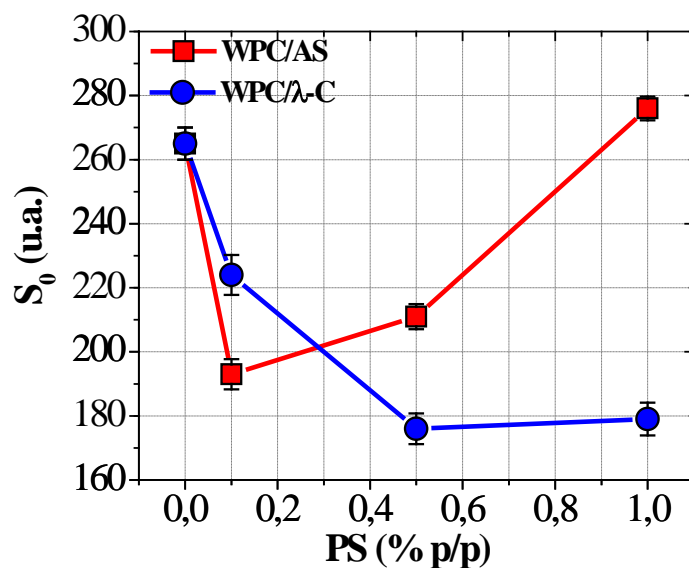


Figura 5.3. Efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-1,0 %p/p) sobre la hidrofobicidad superficial (S_0 u.a.) del WPC. Concentración de WPC 1,0 %p/p, pH 7 y I 0,05 M.

En los sistemas WPC/ λ -C (en el rango de concentración de λ -C evaluado) y WPC/AS a bajas concentraciones de AS (0,1-0,5 %p/p), la disminución del valor de S_0 podría relacionarse con una reducción en el número de sitios hidrofóbicos superficiales del WPC disponibles para su interacción con el ANS. Este comportamiento podría explicarse en términos de dos tipos diferentes de interacciones biopoliméricas (Galazka y col., 1999; Uruakpa y Arntfield, 2006): (i) la existencia de un fenómeno de segregación debido a la incompatibilidad termodinámica entre los biopolímeros lo que podría conducir a una reducción de los sitios hidrofóbicos accesibles al ANS por agregación de la proteína en solución y/o (ii) la existencia de un fenómeno de asociación entre la proteína y los PS lo que podría impedir estéricamente el acceso del ANS para interactuar con los sitios hidrofóbicos superficiales del WPC.

Por otro lado, en el sistema mixto WPC/AS a la mayor concentración de AS evaluada (1,0 %p/p), el aumento del valor de S_0 podría deberse a un incremento en el número de sitios hidrofóbicos superficiales del WPC debido a la modificación de la actividad termodinámica y/o conformación de la proteína en presencia de AS en solución (Pavlovskaya y col., 1993). En estas condiciones, la elevada repulsión entre WPC y AS podría incrementar la exposición de grupos hidrofóbicos del WPC resultando en una mayor interacción con el ANS y, consecuentemente en un mayor valor de S_0 (Uruakpa y Arntfield, 2006). Esta situación sería termodinámicamente desfavorable y el sistema tendería a disminuir el contacto entre los sitios hidrofóbicos superficiales del WPC y el medio acuoso por efecto hidrofóbico promoviendo fenómenos segregativos y/o favoreciendo la adsorción de la proteína sobre interfases fluidas (Grinberg y Tolstoguzov, 1997).

Las hipótesis planteadas sobre el comportamiento de interacción de los sistemas WPC/PS serán probadas en las siguientes Secciones.

5.1.1.3. Interacciones electrostáticas entre el WPC y los PS

En condiciones de pH neutro y baja fuerza iónica, la existencia de un fenómeno de asociación entre el WPC y los PS sería principalmente de naturaleza electrostática involucrando una interacción atractiva entre regiones (*patches*) con carga positiva de las proteínas y los grupos con carga negativa de los PS. Para abordar esta hipótesis, las interacciones electrostáticas entre el WPC y los PS fueron estudiadas a través de una serie de ensayos competitivos aplicando espectroscopía de absorción UV/Vis en presencia de azul de metileno (AM).

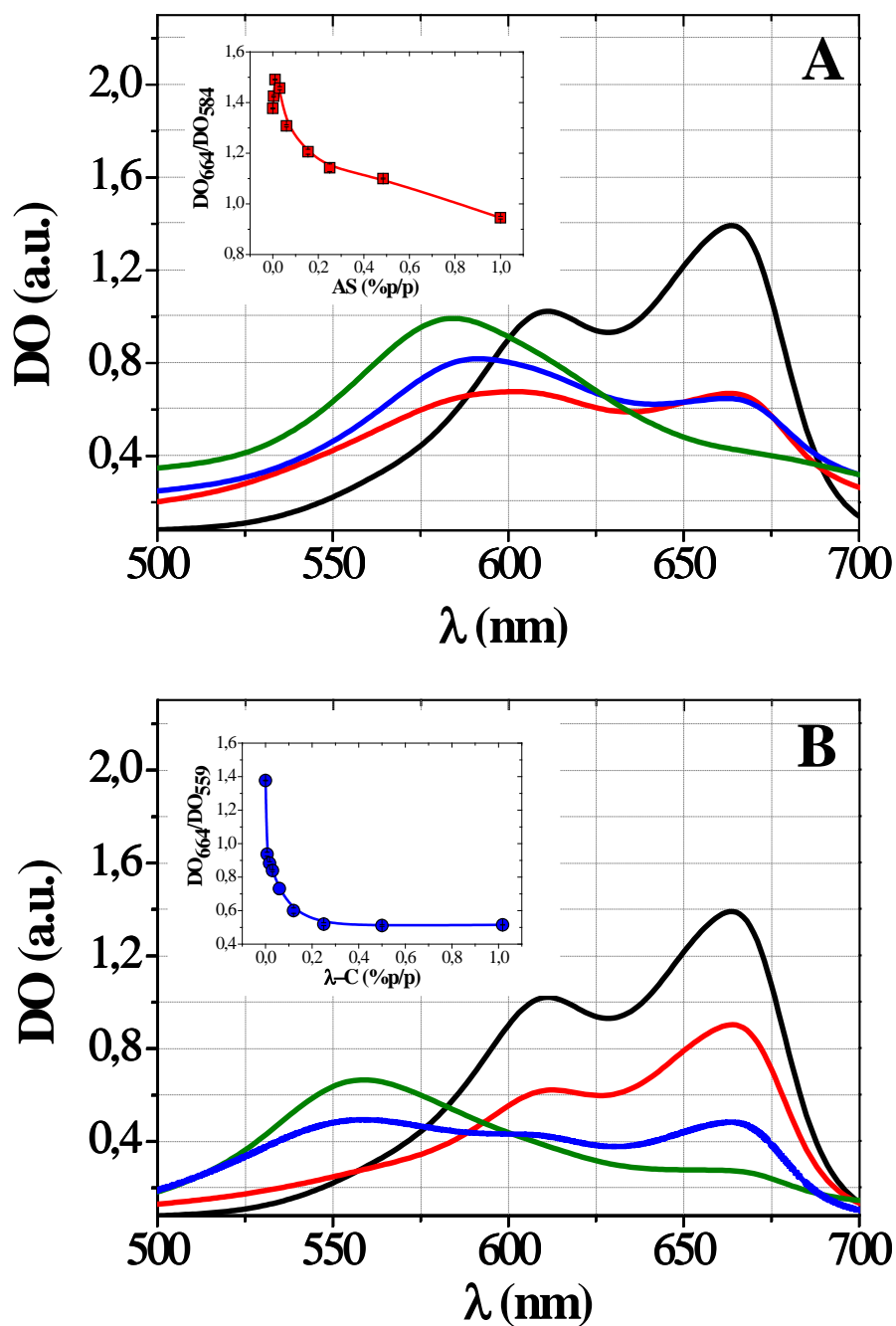


Figura 5.4. Efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-1,0 %p/p) sobre el comportamiento espectral de AM. (A) Sistema AS/AM. (B) Sistema λ -C/AM. Concentración PS: 0,0 %p/p (línea negra), 0,01 %p/p (línea roja), 0,1 %p/p (línea azul), 1,0 %p/p (línea verde). Las Figuras insertas corresponden al efecto de la concentración de los PS sobre el cociente DO_{664}/DO_{PS-AM} . Concentración de AM 0,001 %, p/p, Temperatura 20-23°C, pH 7 y I 0,05M.

En primer lugar, la aplicación de esta técnica implicó abordar el estudio de la respuesta espectral del azul de metileno (AM) en presencia de los PS. El efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-1,0 %p/p) sobre las características espectrales del AM se presenta en la Figura 5.4. Se observó que la adición de los PS produjo un cambio en el comportamiento espectral de AM registrándose una disminución del pico máximo de absorción a 664 nm (reducción en el número de moléculas libres de AM) y un desplazamiento del pico secundario a menores longitudes de onda indicando la formación de complejos metacromáticos (Soedjak, 1994). Además, se observó que la disminución del pico a 664 nm y el desplazamiento y/o posición del pico de máxima absorción de los complejos metacromáticos dependieron del tipo de PS y de su concentración en solución. Debido a esta dependencia, se consideró adecuado tomar la longitud de onda característica de cada complejo metacromático a nivel de la máxima concentración de PS evaluada en todos los ensayos, es decir al 1,0 %p/p. A nivel de la misma, las longitudes de onda de los complejos metacromáticos AS-AM y λ -C-AM fueron 584 y 559 nm, respectivamente.

Una forma alternativa de visualizar los cambios espectrales del AM en presencia de los PS sería a través de la evolución del cociente de densidad óptica DO_{664}/DO_{PS-AM} , con la concentración de PS en solución (insertos en la Figura 5.4). En este caso, DO_{664} correspondería al valor de densidad óptica (DO) del AM libre (a 664 nm) y $DO_{AM/PS}$ sería el valor de DO de los complejos metacromáticos PS-AM (Benichou y col., 2007). Se observó un decrecimiento del cociente de DO_{664}/DO_{PS-AM} con el incremento de la concentración de PS. Este comportamiento podría relacionarse con la progresiva neutralización de las cargas positivas de las moléculas de AM por parte de las cargas

negativas de los PS (Michony col., 2002). Se observó que λ -C al 0,25 %p/p produjo la neutralización total de las cargas del sistema, mientras que una concentración de AS de 1,0 %p/p no fue suficiente para neutralizar las cargas positivas del AM. Estas diferencias podrían ser atribuidas a distintas afinidades de los grupos negativos de los PS por las cargas positivas de las moléculas de AM y/o a las diferentes estructuras moleculares (orientación y distribución de los grupos negativos) de los PS.

Por otro lado, el WPC por ser un polielectrolito también podría tener la capacidad de interactuar electrostáticamente con el AM. Sin embargo, esta interacción no resultaría en la formación de un complejo metacromático (Michon y col., 2000). En tal caso, se observó un aumento en el valor del pico secundario del espectro del AM (a nivel de 613 nm) con el incremento gradual de la concentración de WPC. Resultados similares fueron obtenidos por Benichou y col. (2007) para una muestra de WPI.

Ensayos competitivos a concentración de PS variable

La Figura 5.5 presenta los ensayos competitivos a concentración de WPC constante (1,0 %p/p) y a concentración de PS variable (en el rango de 0,0-1,0 %p/p). Se observó que la adición de AS no produjo cambios en DO_{664}/DO_{584} hasta un valor de concentración de 0,5 %p/p, a partir del cual dicho cociente decreció con el aumento de la concentración de AS a 1,0 %p/p. Este decrecimiento podría vincularse con la presencia del complejo metacromático AS-AM (incremento en DO_{584}), cuya formación se favorece con el aumento de la concentración del polisacárido.

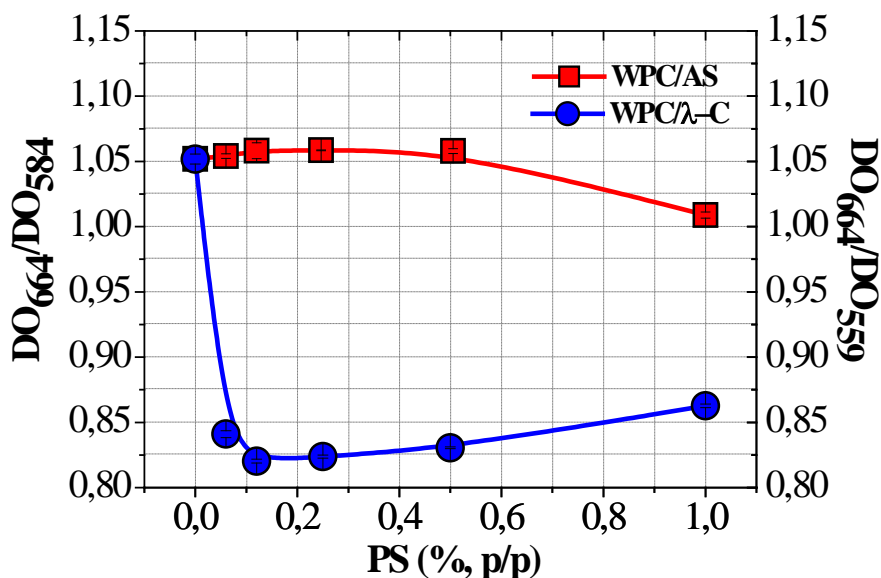


Figura 5.5. Efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-1,0 % p/p) sobre el cociente de densidad óptica DO_{664}/DO_{PS-AM} , de los sistemas WPC/AS y WPC/ λ -C. Concentración de WPC 1,0 % p/p, concentración de AM 0,001 %, p/p, pH 7 y I 0,05M.

Por otro lado, la adición de λ -C a bajas concentraciones (0,05-0,10 % p/p) provocó una gran disminución en el valor de DO_{664}/DO_{559} lo que sugeriría la rápida formación del complejo metacromático λ -C-AM (Michon y col., 2002; Soedjak, 1994). Este resultado podría compararse con la reducción en el valor DO_{664}/DO_{559} a bajas concentraciones de λ -C en ausencia de WPC (inserto de la Figura 5.4B). Además, se observó que a partir de 0,10 % p/p, el aumento en la concentración de λ -C produjo un incremento gradual en el valor de DO_{664}/DO_{559} . Este comportamiento podría interpretarse considerando un aumento en el número de moléculas de AM liberadas a la solución como consecuencia de la disrupción de los complejos metacromáticos formados debido a una interacción electrostática atractiva entre WPC y λ -C. Un

fenómeno similar fue observado por Michon y col. (2002) en el estudio del comportamiento de interacción entre gelatina y ι -C.

Efecto de la concentración de NaCl

La fuerza de las interacciones entre proteínas y polisacáridos depende fuertemente de las condiciones del medio acuoso, tales como pH, fuerza iónica y concentración relativa de biopolímeros (Tolstoguzov, 2003). Para probar la existencia de interacciones electrostáticas atractivas en los sistemas WPC/PS se realizaron ensayos en presencia de NaCl.

En una primera etapa, se analizó el efecto de NaCl (en el rango de concentración de 0-1 M) sobre el comportamiento espectral de los complejos metacromáticos PS-AM (Figura 5.6). Se observó que ambos complejos se comportaron de una manera diferente frente al incremento de la concentración de sal.

La adición de bajas concentraciones de NaCl al sistema AS/AM produjo un incremento en el valor de DO_{664}/DO_{584} , lo que podría atribuirse a la liberación de moléculas de AM a la solución (incremento en DO_{664}) como resultado de la disrupción del complejo metacromático AS-AM. Este comportamiento podría explicarse en términos de una competencia entre el AM (cargado positivamente) y los iones Na^+ por los grupos carboxilato (negativos) de la cadena de AS. Sin embargo, la adición de altas concentraciones de sal provocó una reducción en el valor de DO_{664}/DO_{584} (incremento en DO_{584}) lo que sugeriría la re-asociación de las moléculas de AM y AS para formar nuevamente el complejo metacromático AS-AM.

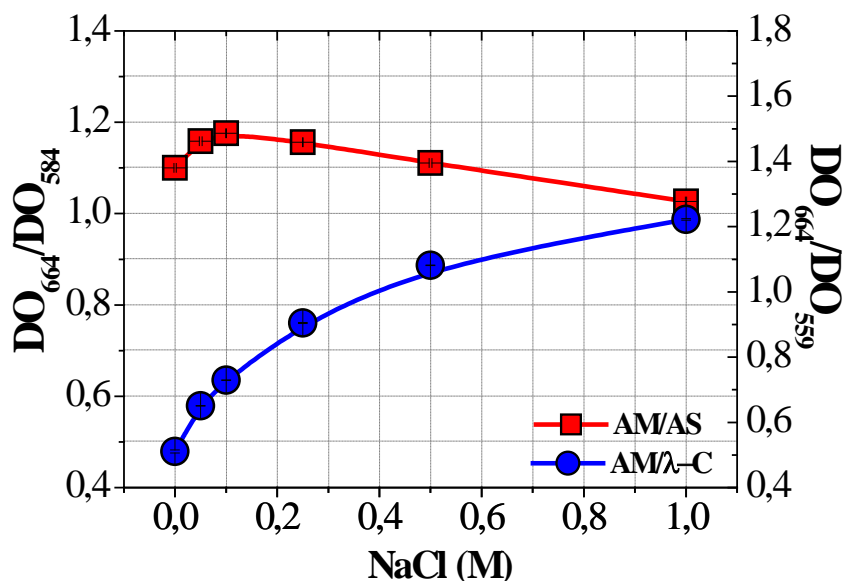


Figura 5.6. Efecto del NaCl (en el rango de concentración de 0-1 M) sobre el comportamiento espectral de los sistemas PS/AM. Concentración de PS 0,5 %p/p, concentración de AM 0,001 % p/p, pH 7 y I 0,05M.

Este comportamiento inesperado podría explicarse sobre la base de la particular estructura molecular del AS. Como se describió en la sección 1.4.2.2, el AS es un copolímero de ácido gulurónico (G) y manurónico (M) y su cadena está organizada en bloques tipo GG, MM y GM. Esta inhomogeneidad estructural podría tener algún efecto sobre las interacciones atractivas entre AM y AS permitiendo que ciertas regiones sean más o menos adecuadas para la formación del complejo metacromático. Además, la modificación de la fuerza iónica del medio acuoso ejerce un rol determinante de la orientación de los grupos polares de la cadena y, consecuentemente, sobre la viscosidad de las dispersiones de AS (Moe y col., 1995). De esta manera, el efecto de la fuerza iónica sobre las características moleculares del AS podría afectar indirectamente, y de manera compleja, a la formación del complejo metacromático AS-AM.

Por otro lado, se observó que el aumento de la concentración de NaCl en el sistema λ -C/AM produjo un incremento gradual del valor de DO_{664}/DO_{559} , lo que sugeriría una liberación progresiva de moléculas de AM a la solución (incremento en DO_{664}) como resultado de la disrupción del complejo metacromático λ -C-AM. Este comportamiento podría deberse a una competencia entre los iones Na^+ y el AM (cargado positivamente) por los grupos sulfato (negativos) de λ -C. Es importante remarcar que el mismo perfil de DO_{664}/DO_{PS-AM} como una función de la concentración de NaCl fue obtenido para diferentes concentraciones de PS en el rango de 0,1-1,0 % p/p.

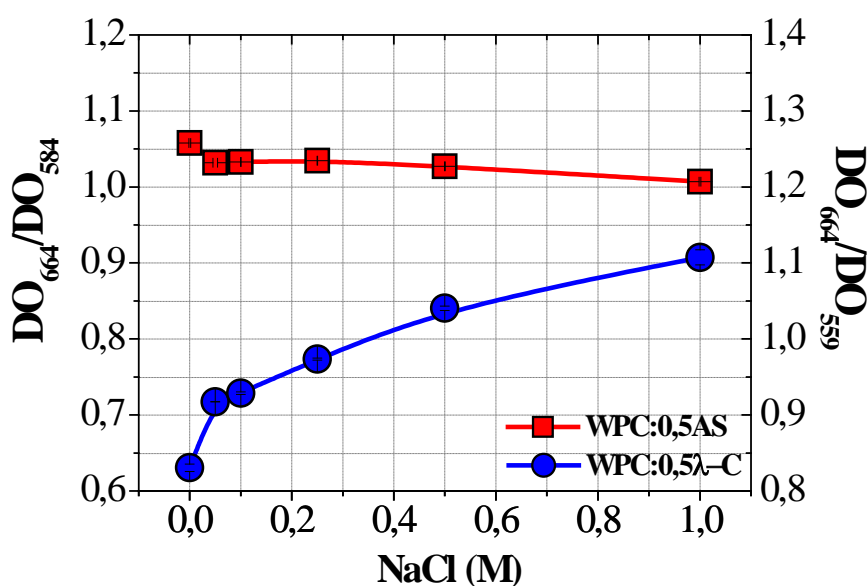


Figura 5.7. Efecto del NaCl (en el rango de concentración de 0-1 M) sobre el cociente de densidad óptica, $DO_{664}/DO_{AM/PS}$, de los sistemas WPC/AS y WPC/ λ -C (1,0:0,5 %p/p). Concentración de AM 0,001 %p/p, pH 7 y I 0,05M.

Finalmente, la Figura 5.7 presenta el efecto de la adición de NaCl sobre los valores de DO_{664}/DO_{PS-AM} de los sistemas WPC:0,5PS (1,0:0,5% p/p). Se observó que

la magnitud de valores de DO_{664}/DO_{584} para el sistema mixto WPC:0,5AS disminuyó levemente con el incremento de la concentración de sal (como también puede observarse en la Figura 5.6).

Por otro lado, el aumento de la concentración de NaCl en el sistema mixto WPC:0,5 λ -C provocó un incremento en el valor de DO_{664}/DO_{559} . Este resultado podría relacionarse con una mayor cantidad de AM libre en la fase acuosa que podría provenir de la disrupción de complejos metacromáticos residuales, es decir, de las macromoléculas de λ -C (unidas a AM) que no interaccionarían atractivamente con el WPC.

En virtud de estos resultados, sería adecuado suponer que la magnitud de los valores de DO_{664}/DO_{PS-AM} de la Figura 5.7 podría estar influenciada por la respuesta de los complejos metacromáticos frente al agregado de NaCl (Figura 5.6). Por lo tanto, para observar el verdadero efecto de la adición de NaCl sobre las interacciones electrostáticas entre el WPC y los PS, al perfil de DO_{664}/DO_{PS-AM} de la Figura 5.7 se le sustrajo el perfil de DO_{664}/DO_{PS-AM} de la Figura 5.6 (Michon y col., 2000). Este resultado es presentado en la Figura 5.8 como un delta de DO_{664}/DO_{PS-AM} (ΔDO). De acuerdo a Michon y col. (2000), valores positivos de ΔDO indicarían que la dinámica molecular de los sistemas mixtos estaría mayormente gobernada por interacciones atractivas entre el WPC y los PS; mientras que valores negativos de ΔDO indicarían la ausencia de interacciones atractivas entre los biopolímeros.

En ausencia de NaCl, el sistema mixto WPC:0,5AS presentó un valor de ΔDO negativo (Figura 5.8A), un comportamiento que sugeriría la ausencia de interacciones atractivas entre el WPC y AS. Para este sistema, los valores de ΔDO alcanzaron un

valor mínimo cuando la concentración de sal fue 0,1 M indicando que una pequeña adición de electrolitos podría apantallar completamente las cargas tanto en la proteína como en el polisacárido. Un aumento de la concentración de NaCl produjo un incremento gradual en ΔDO . Este comportamiento podría vincularse con una mayor tendencia del sistema hacia la separación de fases segregativa inducida por el aumento de la fuerza iónica del medio acuoso.

La fuerza de los fenómenos segregativos o de incompatibilidad termodinámica entre proteínas y polisacáridos aniónicos depende fuertemente de las características estructurales de los biopolímeros, tales como su peso molecular y conformación, y de su concentración relativa en solución. Como se ha expuesto en la sección 3.1.2.2, la magnitud de la incompatibilidad entre proteínas y polisacáridos decrece en el orden: polisacáridos carboxílicos > polisacáridos neutros > polisacáridos sulfatados (Grinberg y Tolstoguzov, 1997).

La incompatibilidad entre proteínas y polisacáridos carboxílicos toma lugar a valores de pH por arriba del pI de la proteína y para cualquier valor de fuerza iónica del medio acuoso. Por lo tanto, en virtud de los resultados obtenidos se puede deducir que el comportamiento observado en los sistemas WPC/AS fue consistente con la bibliografía.

Por otro lado, en ausencia de NaCl, el sistema mixto WPC:0,5 λ -C presentó un valor positivo de ΔDO lo que podría sugerir la existencia de interacciones atractivas entre WPC y λ -C. El aumento de la concentración de NaCl provocó una disminución gradual en ΔDO hasta alcanzar valores negativos. Este resultado pondría en evidencia la reducción de las interacciones atractivas entre WPC y λ -C tras la adición de cantidades

crecientes de electrolitos. A elevadas concentraciones de sal, los electrolitos podrían apantallar las cargas tanto en la proteína como en el polisacárido, previniendo las interacciones atractivas.

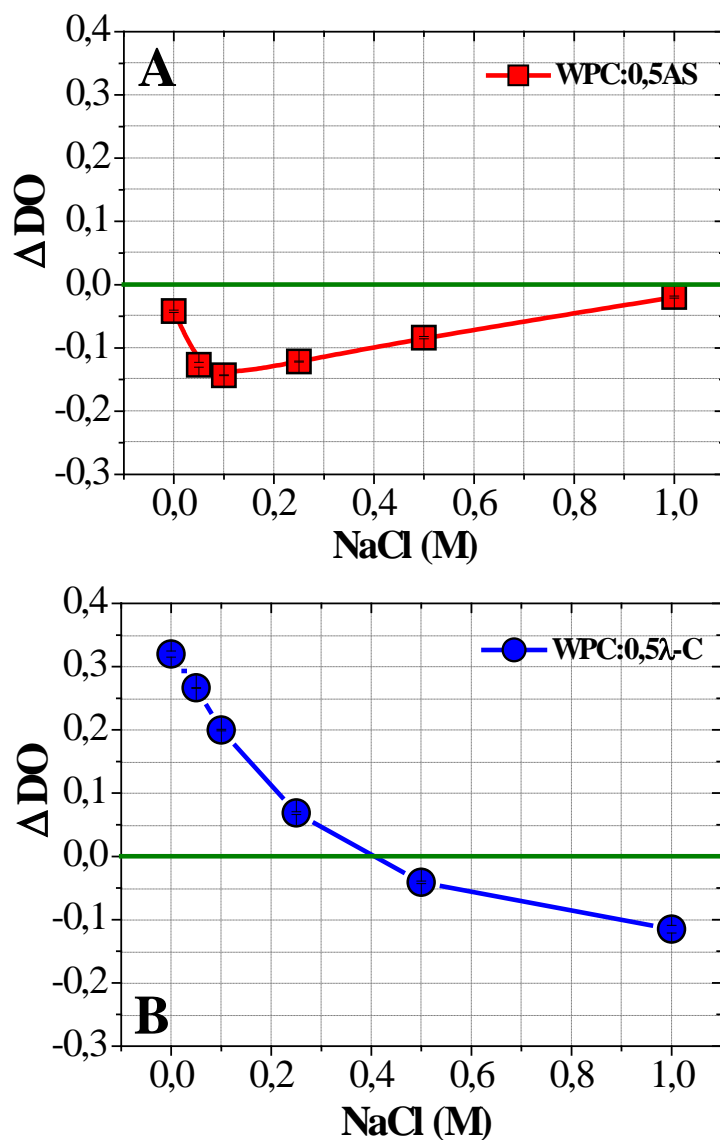


Figura 5.8. Efecto del NaCl (en el rango de concentración de 0-1 M) sobre las interacciones entre WPC y PS representadas por la diferencia entre los perfiles de $DO_{664}/DO_{AM/PS}$ (ΔOD) para (A) el sistema mixto WPC:0,5AS (1,0:0,5 %p/p) y (B) para el sistema mixto WPC:0,5 λ -C (1,0:0,5 %p/p). Concentración de AM 0,001 %p/p, pH 7 y I 0,05M.

A pH neutro y baja fuerza iónica (0,05 M), el comportamiento observado en los sistemas WPC/ λ -C podría explicarse considerando la formación de complejos solubles vía interacciones electrostáticas atractivas locales entre aminoácidos con carga positiva (Lys, Hys, Arg) y los grupos sulfatos altamente electronegativos del polisacárido (Tolstoguzov y col., 1986; Galazka y col., 1999). Según Grinberg y Tolstoguzov (1997), los sistemas mixtos formados por polisacáridos sulfatados (tales como las carrageninas) y proteínas son completamente compatibles en un amplio rango de valores de pH (hasta pH \sim 7,5) y por debajo de una concentración de sal de aproximadamente 0,3 M. Por arriba de esta concentración de sal crítica y a valores de pH cercanos a la neutralidad ocurriría la disociación de estos complejos y el sistema tendería a la separación de fases segregativa inducida por el aumento de la fuerza iónica del medio acuoso, tal como se ha expuesto en la sección 3.1.2.3. Por lo tanto, se puede concluir que los resultados obtenidos para los sistemas WPC/ λ -C fueron consistentes con la literatura científica.

5.1.1.4. Efecto de los PS sobre la ultraestructura del WPC

Las Figuras 5.9 y 5.10 presentan el efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-1,0 %p/p) sobre la ultraestructura de una dispersión de WPC al 1,0% p/p. En estas micrografías, las áreas claras corresponden a la fluorescencia del ANS lo que revelaría la presencia del WPC y las áreas oscuras corresponden a la localización de los PS en los sistemas mixtos. Las Figuras 5.9a y 5.10a presentan la micrografía confocal correspondiente a la dispersión WPC a 40 \times .

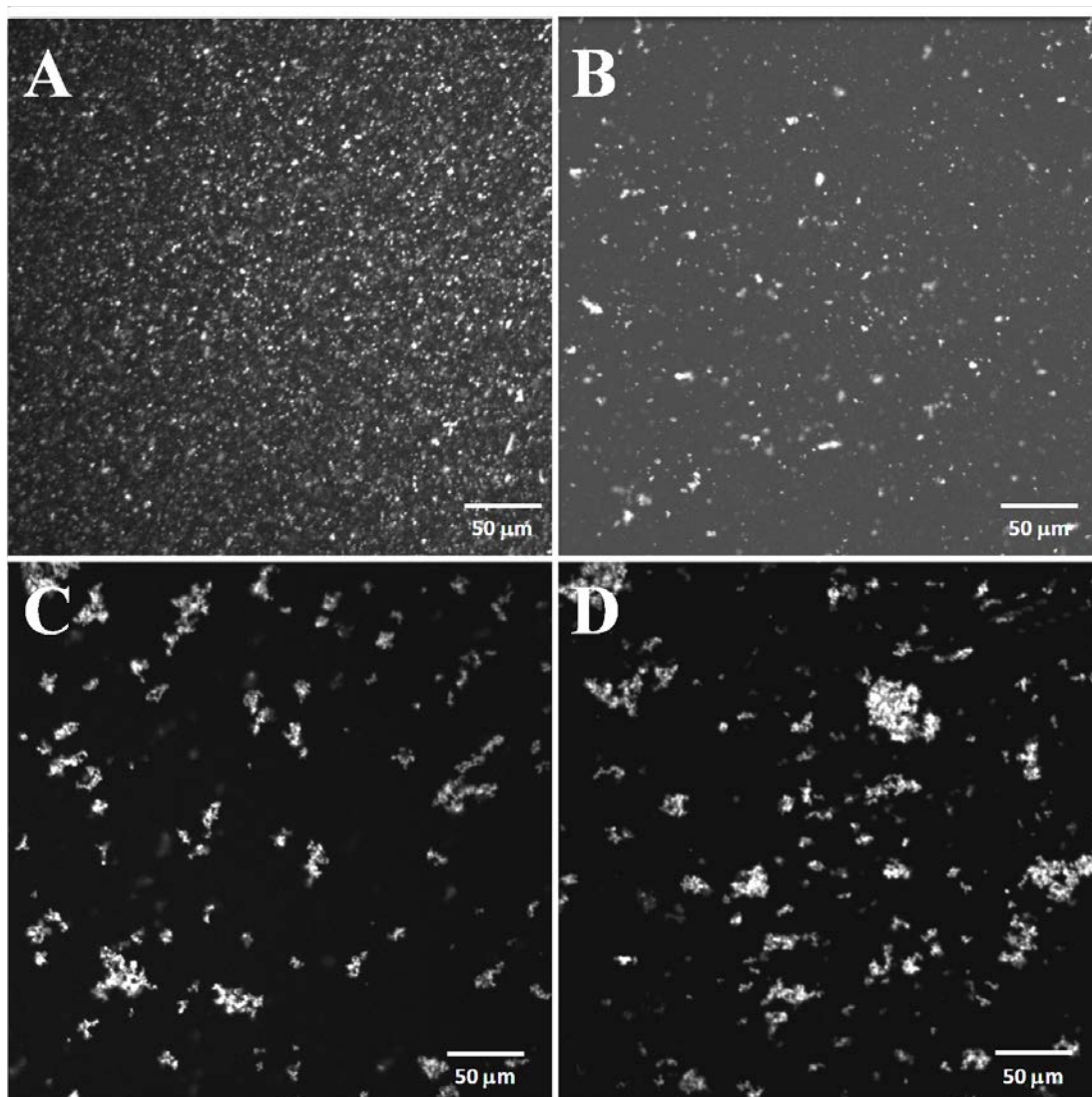


Figura 5.9. Efecto de AS (en el rango de concentración de 0,0-1,0 %p/p) sobre la ultraestructura (a 40×) de una dispersión de WPC al 1,0 %p/p. Micrografías confocales: (a) Dispersión de WPC en ausencia de AS, (b) Sistema mixto WPC:0,1AS (1,0:0,1 %p/p), (c) Sistema mixto WPC:0,5AS (1,0:0,5AS %p/p), (d) Sistema mixto WPC:AS (1,0-1,0 %p/p). Temperatura 20-23°C, pH 7 y I 0,05M.

El análisis microscópico reveló la existencia de pequeños agregados de WPC distribuidos homogéneamente. Este resultado fue consistente con las determinaciones de SEC-HPLC y de porcentaje de proteína desnaturizada comentadas y discutidas en la Sección 4.1.1.1. La existencia de estas estructuras se relacionaría con la agregación

del WPC debido a la desnaturalización térmica de las proteínas durante su proceso de obtención industrial.

La Figura 5.9B presenta la micrografía confocal del sistema mixto WPC:0,1AS (1,0:0,1 %p/p) a 40×. Se observó una marcada disminución de la fluorescencia del campo y una distribución inhomogénea de los agregados de WPC en una gran región ocupada por el AS. Una mayor magnificación (200×) permitió la distinción de agregados proteicos de un tamaño levemente mayor a los agregados de la dispersión de WPC al 1,0 %p/p. Las Figuras 5.9C y 5.9D presentan las características ultraestructurales de los sistemas WPC:0,5AS (1,0:0,5 % p/p) y WPC:AS (1,0:1,0% p/p) a 40×, respectivamente. Estas micrografías revelaron la existencia de microdominios de WPC esparcidos sobre una gran región ocupada por el AS. Se observó que el aumento de la concentración de AS promovió la formación de grandes microdominios de WPC.

La formación de microdominios de WPC sería debido a un fenómeno segregativo con agregación de la proteína (Bourriot y col., 1999; Hemar y col., 2001) siendo el mismo favorecido por el aumento de la concentración de AS. El aumento de la concentración de AS en los sistemas WPC/AS podría provocar en primer lugar, la segregación y agregación de la fracción desnaturalizada (agregada) de WPC (Figura 5.9B) y luego la segregación de la fracción nativa (Figuras 5.9C y 5.9D). La presencia de agregados de WPC podría ejercer una gran influencia sobre los fenómenos segregativos en los sistemas WPC/AS (Dickinson y McClements, 1995; Sánchez y col., 1997; Syrbe y col., 1995). Como dichos agregados poseen una masa molar mucho mayor que la de las proteínas individuales, el término de energía libre asociado a la entropía de mezclado que favorece la distribución aleatoria de las macromoléculas en

solución podría reducirse y como resultado, la incompatibilidad termodinámica entre los biopolímeros sería más pronunciada (Dickinson y McClements, 1995; Schmitt y col., 1998).

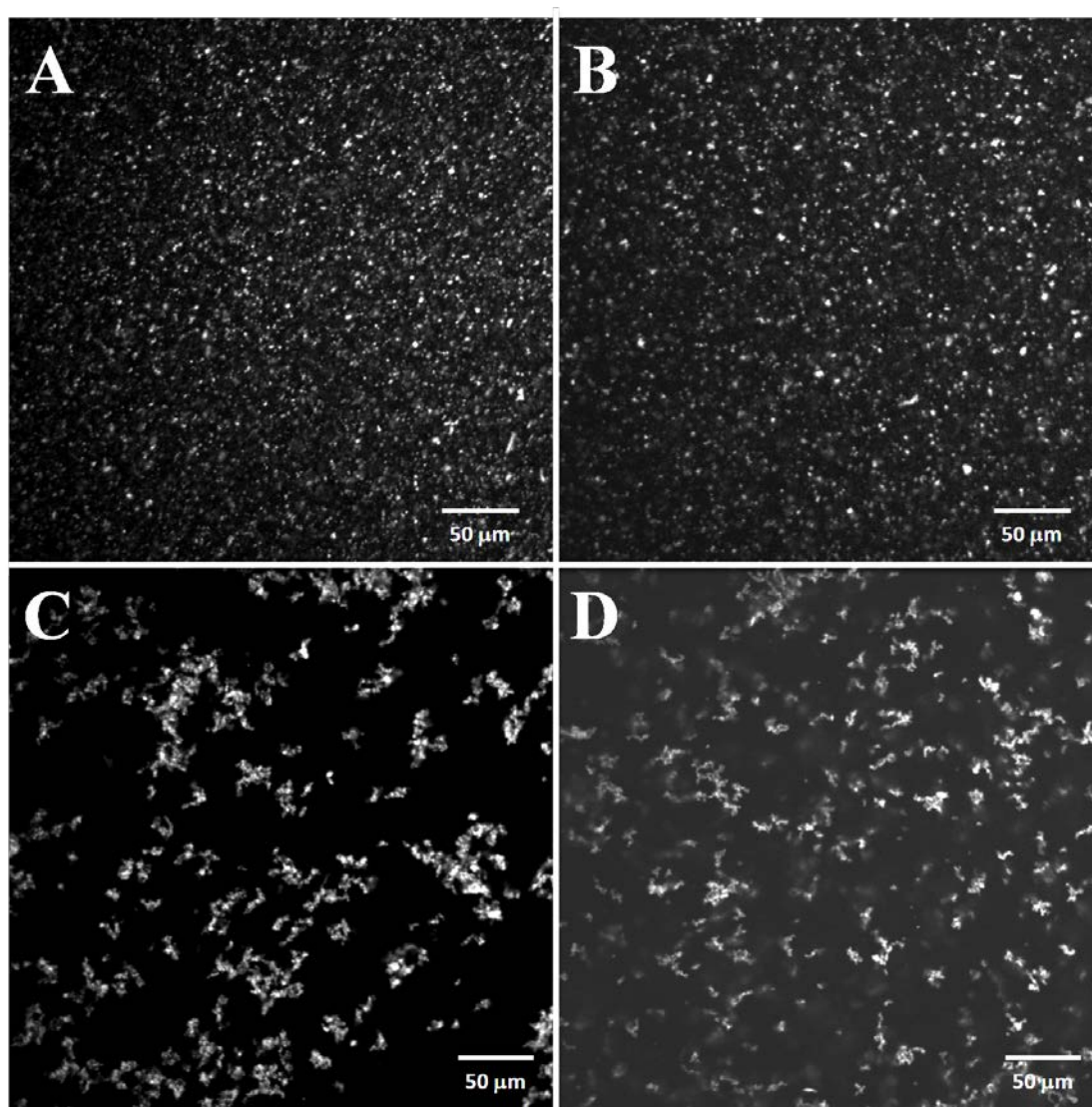


Figura 5.10. Efecto de λ -C (en el rango de concentración de 0,0-1,0 %p/p) sobre la ultraestructura (a 40 \times) de una dispersión de WPC al 1,0 %p/p. Micrografías confocales: (a) Dispersión de WPC en ausencia de λ -C. (b) Sistema mixto WPC:0,1 λ -C (1,0:0,1 %p/p). (c) Sistema mixto WPC:0,5 λ -C (1,0:0,5 %p/p). (d) Sistema mixto WPC: λ -C (1,0-1,0 %p/p). Temperatura 20-23°C, pH 7 y I 0,05M.

Por lo tanto, los resultados del análisis ultraestructural para los sistemas WPC/AS podrían considerarse consistentes con los resultados obtenidos por fluorescencia tanto intrínseca como extrínseca comentados y discutidos en las secciones 5.1.1.1 y 5.1.1.2, respectivamente.

Por otro lado, la Figura 5.10B presenta la micrografía confocal del sistema mixto WPC:0,1 λ -C (1,0:0,1 %p/p) a 40 \times . Se observó una distribución homogénea de agregados de WPC prácticamente en todo el campo de visión. Una mayor magnificación (200 \times) reveló que el tamaño y la forma de estos agregados fueron similares a los de la dispersión de WPC al 1,0 %p/p.

Las Figuras 5.10C y 5.10D presentan la ultraestructura de los sistemas WPC:0,5 λ -C (1,0:0,5% p/p) y WPC: λ -C (1,0:1,0 %p/p) a 40 \times , respectivamente. Se observó que el aumento de la concentración de λ -C promovió la formación de microdominios de WPC esparcidos homogéneamente en una región ocupada por el polisacárido. A elevadas concentraciones de λ -C, el tamaño y/o la forma de los microdominios de WPC pareció no depender de la concentración relativa de biopolímeros en los sistemas mixtos.

Efecto de la concentración de NaCl

La Figura 5.11 presenta el efecto del NaCl (en el rango de concentración de 0,0-1,0 M) sobre la ultraestructura de los sistemas WPC:0,5PS a 40 \times .

Las Figuras 5.11A-C presentan las micrografías del sistema WPC:0,5AS con 0,0, 0,5 y 1,0 M de NaCl, respectivamente. En ausencia de sal, se observó la presencia de

microdominios de WPC esparcidos sobre una gran región ocupada por el AS (como también puede deducirse a partir de la Figura 5.9C).

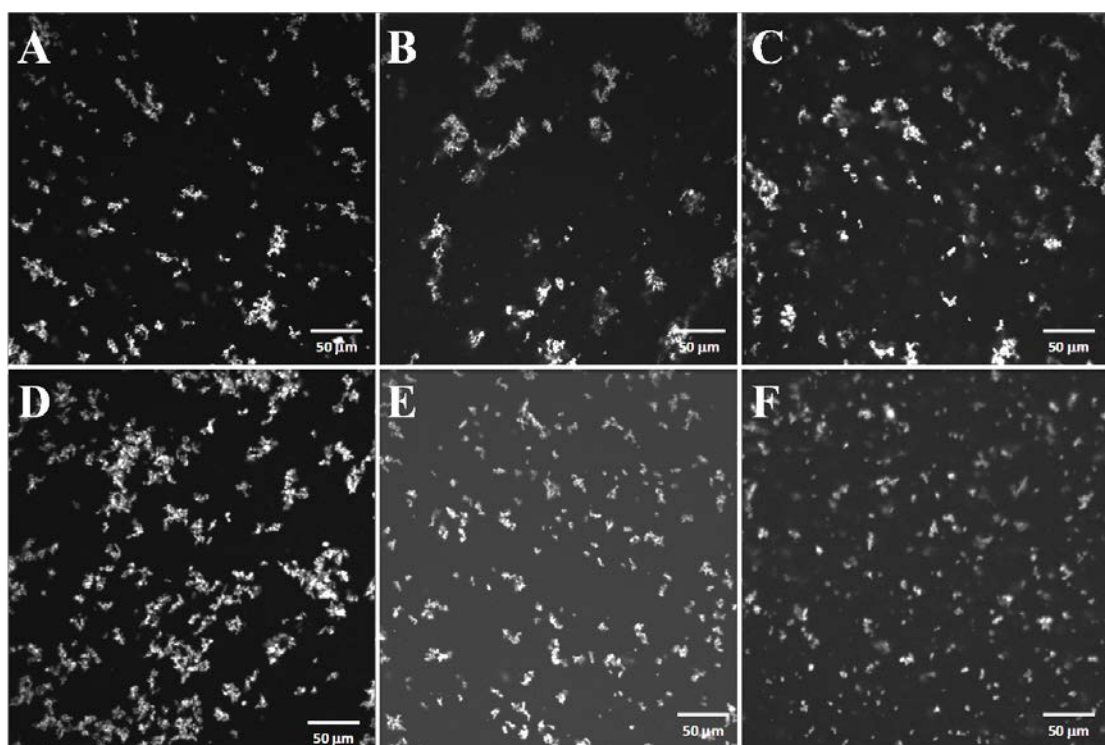


Figura 5.11. Efecto de la concentración de NaCl sobre la ultraestructura de los sistemas WPC/PS. Micrografías confocal para el sistema WPC:0,5SA (1,0:0,5 %p/p) a 40×: (a) sin NaCl, (b) NaCl 0,5 M y (c) NaCl 1 M. Micrografías confocales para el sistema WPC:0,5λ-C (1,0:0,5 %p/p) a 40×: (d) sin NaCl, (e) NaCl 0,5 M y (f) NaCl 1 M.

En presencia de 0,5 M de NaCl (Figura 5.11B), se observó que el tamaño relativo de los microdominios de WPC no se modificó. En estas condiciones, la adición de electrolitos podría apantallar las cargas tanto en el WPC como en el AS y el sistema podría no manifestar cambios a nivel ultraestructural. Sin embargo, el aumento de la concentración de NaCl a 1,0 M (Figura 5.11C) produjo una distribución más

homogénea y un aumento en el número de microdominios de WPC esparcidos en la región ocupada por el AS. A elevadas concentraciones de sal el sistema podría acentuar su tendencia hacia la separación de fases segregativa.

Por otro lado, las Figuras 5.11D-F, presentan las micrografías del sistema mixto WPC:0,5 λ -C con 0,0, 0,5 y 1,0 M de NaCl a 40 \times , respectivamente. En ausencia de sal, se observó la presencia de microdominios de WPC homogéneamente distribuidos prácticamente en todo el campo de visión (como también puede deducirse a partir de la Figura 5.10C). La adición de 0,5 M de NaCl (Figura 5.11E) provocó una aparente disrupción de los microdominios de WPC. En tales condiciones se observaron pequeños microdominios de WPC esparcidos en una gran región ocupada por λ -C. El aumento de la concentración de NaCl a 1,0 M (Figura 5.12F) produjo una distribución más homogénea y un aumento en el número de pequeños microdominios de WPC. Estos resultados pondrían en evidencia la reducción de las interacciones atractivas entre WPC y λ -C tras la adición de cantidades crecientes de electrolitos y el sistema tendería a la separación de fases segregativa.

En general, se podría concluir que los resultados del análisis ultraestructural para los sistemas WPC/AS y WPC/ λ -C en presencia de NaCl fueron consistentes con los obtenidos por espectroscopía de absorción UV/Vis en presencia de AM comentados y discutidos en la sección 5.1.1.3

En resumen, los resultados encontrados sugerirían que la dinámica molecular del WPC estuvo fuertemente afectada por la presencia de los PS en solución acuosa en condiciones de pH neutro y baja fuerza iónica. Los estudios complementarios realizados en los sistemas WPC/AS y WPC/ λ -C revelaron diferencias significativas en el

comportamiento de interacción de ambos tipos de sistemas, dependiendo de la estructura química de los PS, de su concentración en la fase acuosa y de las distintas fracciones proteicas (nativa y desnaturalizada o agregada) presentes en la muestra de WPC.

5.1.2. Efecto de la adición de polisacáridos sobre la dinámica interfacial del WPC

5.1.2.1. Propiedades superficiales del WPC en el equilibrio

Las propiedades de equilibrio de las películas adsorbidas son de enorme utilidad para la interpretación de las propiedades dinámicas y estructurales de las proteínas adsorbidas sobre interfases fluidas (Damodaran, 1990; Rodríguez Patino y col., 2003). La caracterización de las películas de WPC adsorbido sobre la interfase aire-agua en el equilibrio podría permitir la selección de la concentración de proteína en solución más adecuada para la realización de los estudios dinámicos de adsorción interfacial en presencia de los PS.

El efecto de la concentración de proteína (1.10^{-6} -2,0 %p/p) en la subfase acuosa sobre la magnitud de la presión superficial de equilibrio- π_{eq} (isoterma de adsorción) de las películas de WPC adsorbido sobre la interfase aire-agua se presenta en la Figura 5.12. En dicha Figura se adicionaron los valores de π_{eq} de una película adsorbida de WPI. Se observó que ambas proteínas presentaron isotermas de adsorción sigmoideas y que los valores de π_{eq} fueron similares por debajo de 1.10^{-2} %p/p. A partir de esta

concentración, las diferencias en π_{eq} podrían relacionarse con diferencias en las características superficiales de estas muestras de proteína.

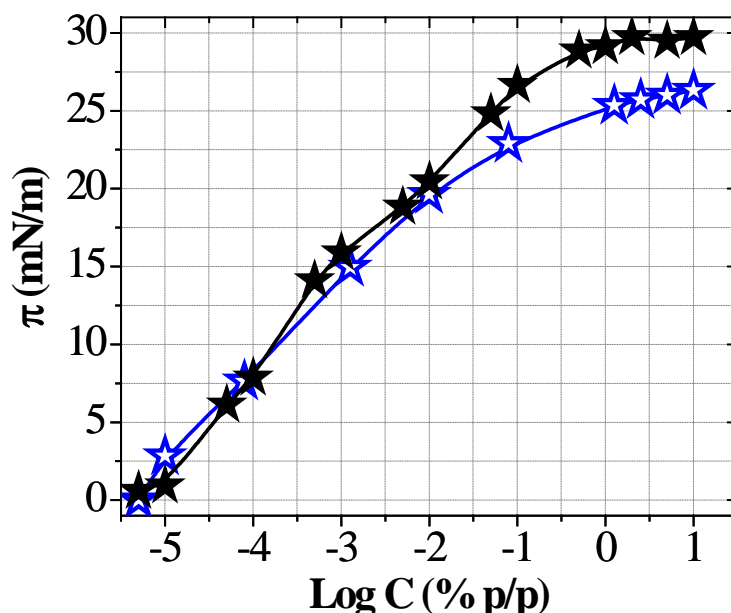


Figura 5.12. Efecto de la concentración de proteína (1.10^{-6} -2,0 %p/p) en la subfase acuosa sobre la magnitud de la presión superficial en el equilibrio- π_{eq} (isoterma de adsorción) de las películas de WPC (★) y de WPI (☆) adsorbidos sobre la interfase aire-agua. Temperatura 20 °C, pH 7 y I 0,05 M.

Como también puede observarse en la Figura 5.12, las isotermas de adsorción alcanzaron un *plateau* a nivel de una concentración de 1,0 %p/p. Este valor de concentración correspondería a la concentración de proteína en la subfase acuosa que sería capaz de saturar la interfase aire-agua, lo que comúnmente se conoce como eficiencia de adsorción (Graham y Phillips, 1979). En la presente investigación, se escogió este valor de concentración de WPC (1,0 %p/p) para la realización de los estudios dinámicos interfaciales en presencia de PS. La formación de una película

interfacial saturada en proteína podría ser un requisito importante para lograr la creación de una espuma y para permitir su estabilidad frente a distintos mecanismos de desestabilización (Carrera y Rodríguez Patino, 2005).

Por otro lado, a nivel de la eficiencia de adsorción, el valor de π_{eq} se conoce normalmente como actividad superficial (Graham y Phillips, 1979). Se observó que la actividad superficial del WPC fue más alta que la del WPI lo que podría relacionarse con su alto contenido de grasa residual y/o con la existencia de una fracción de proteína desnaturalizada (agregada) en la muestra (como ha sido descrito en la sección 4.1.1.1).

5.1.2.2. Efecto de los PS sobre la formación de películas de WPC

Las proteínas de suero lácteo presentan una gran tendencia a adsorberse sobre la interfase aire-agua. Sin embargo, dicho proceso de adsorción podría ser influenciado por la presencia de PS en la subfase acuosa.

La Figura 5.13 presenta el efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-1,0% p/p), sobre la evolución temporal de la presión superficial (π) de la película de WPC en condiciones de saturación de la interfase aire-agua (1,0 %p/p). En esta Figura se adicionaron los valores de π de una película de WPI. En general, se observó que los valores de π aumentaron con el tiempo (θ), un fenómeno que podría vincularse con la adsorción de las proteínas sobre la interfase aire-agua (Graham y Phillips, 1979; Damodaran y Song, 1988; MacRitchie, 1990). Además, se observó que los valores de π para la película de WPC fueron mayores que para la película de WPI. Si bien, ambas muestras poseen una fracción mayoritaria de β -LG, este resultado podría asociarse con

la presencia de impurezas grasas (Corneç y Narsimhan, 1998) y/o otros componentes superficialmente activos en la muestra de WPC (Martínez y col., 2009b) los que podrían también influir sobre la dinámica de formación de su película interfacial.

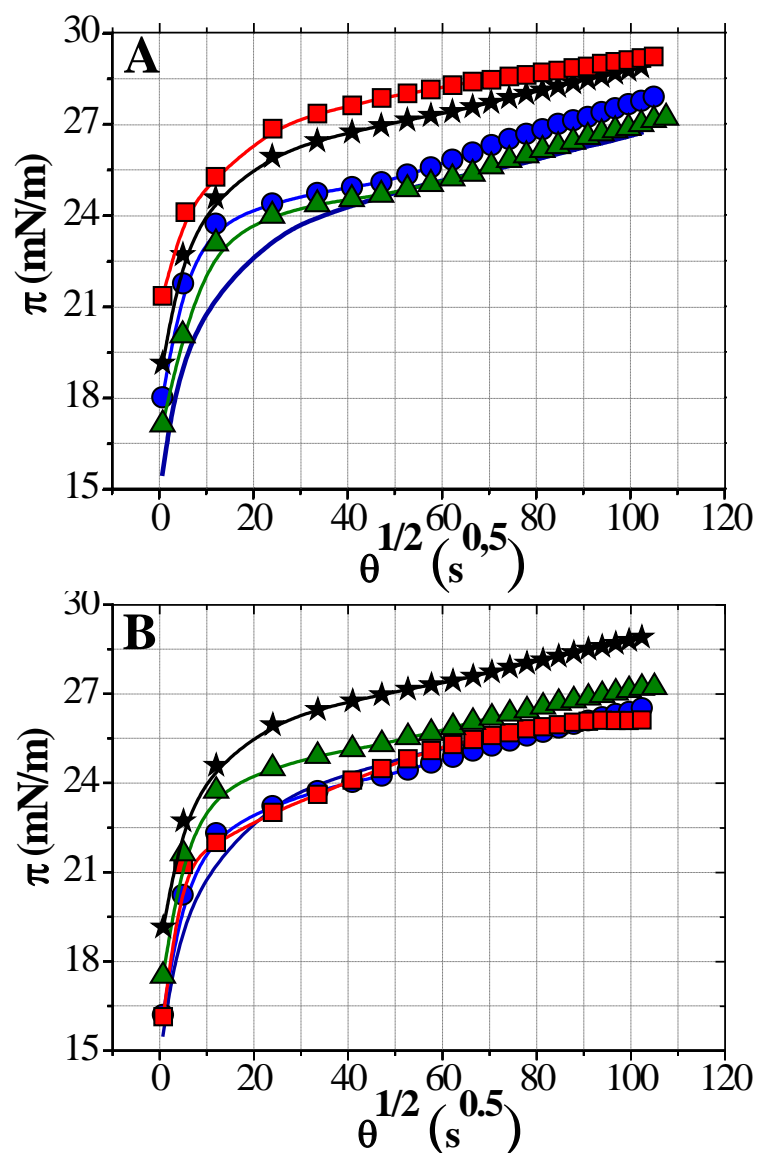


Figura 5.13. Efecto de la concentración de PS sobre la evolución temporal de la presión superficial (π , mN/m) de las películas de WPC adsorbido sobre la interfase aire-agua. (A) Sistemas WPC/AS, (B) Sistemas WPC/λ-C. Símbolos sistemas Prot:AS: (★) 1,0:0,0 %p/p, (■) 1,0:1,0 %p/p, (●) 1,0:0,5 %p/p, (▲) 1,0:0,1 %p/p. Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05 M. Datos para la película de WPI incluida como referencia (—).

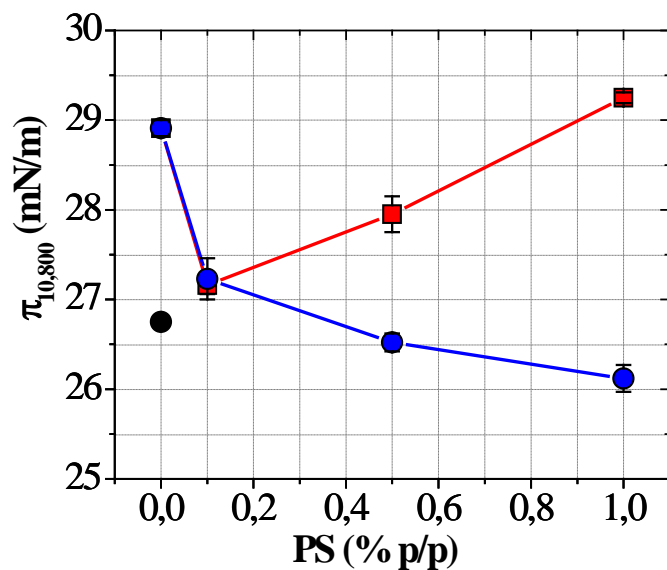


Figura 5.14: Efecto de la concentración de PS sobre la presión superficial (π , mN/m) a los 10.800 s de adsorción ($\pi_{10.800}$) para las películas de los sistemas (□) WPC/AS y (○) WPC/ λ -C. Concentración de WPC 1,0% p/p, temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05 M. El valor π_{10800} (●) para el WPI es incluido como una referencia.

Por otro lado, se observó que a largos θ , la presencia de PS modificó los valores de π de la película de WPC dependiendo del tipo de PS y de su concentración relativa en la subfase acuosa (Figura 5.14). Este resultado constituye una evidencia de que las interacciones macromoleculares entre los biopolímeros tanto en la subfase acuosa como en el entorno de la interfase aire-agua podrían influir en la dinámica de formación de la película de WPC adsorbido sobre la interfase aire-agua. La naturaleza de las interacciones entre WPC y PS y sus efectos sobre la dinámica de formación de películas de WPC adsorbido sobre la interfase aire-agua se discutirán en las siguientes Secciones desde un punto de vista cinético.

5.1.2.3. Efecto de los PS sobre la cinética de adsorción interfacial del WPC

La cinética de adsorción interfacial de proteínas puede determinarse a través de los cambios en los valores de π . Como se mencionó en la sección 3.2.2.2, las principales etapas de adsorción interfacial de proteínas (MacRitchie, 1990) son: (i) difusión desde la subfase acuosa hacia la interfase, (ii) adsorción, penetración y desplegamiento interfacial, y (iii) reordenamiento dentro de la película adsorbida, formación de multicapas e incluso gelificación interfacial. El efecto de los PS sobre cada una de las etapas de adsorción interfacial del WPC se discutirá a continuación.

Difusión hacia la interfase aire-agua

El paso más importante en la formación de una espuma es la adsorción inicial de la proteína sobre la interfase aire-agua (Rodríguez Patino y col., 2007a). Como se mencionó en la sección 4.2.3.1, durante el primer paso una forma modificada de la ecuación de Ward y Tordai (Ecuación 4.4) podría usarse para correlacionar los cambios en la presión superficial (π) con el tiempo (θ). Si la difusión controla el proceso de adsorción de la proteína, una gráfica de π vs $\theta^{1/2}$ será lineal (De Feijter y Benjamins, 1987; MacRitchie, 1990; Xu y Damodaran, 1994; Rodríguez Patino y col., 2007a; 2007b) y la pendiente de esta curva será la constante de velocidad de difusión (k_{dif}).

A nivel de la concentración de WPC evaluada en el presente estudio (1,0 %p/p), se observó que el paso de difusión (tanto en ausencia como en presencia de PS) fue muy rápido (con $\pi > 10$ mN/m) por lo que no pudo ser detectado por el dispositivo

experimental empleado (Figura 5.13). El mismo comportamiento fue observado para la difusión del WPI (Figura 5.13), β -LG pura (Álvarez y Rodríguez Patino, 2006) y globulinas de soja (7S y 11S) a una concentración en solución de 1,0 %p/p (Rodríguez Patino y col., 2004). Este resultado sugeriría que a cortos θ , el proceso de adsorción del WPC y de los sistemas WPC/PS, no estaría controlado por un transporte difusivo hacia la interfase. Sin embargo, la pendiente de la curva $\pi-\theta^{1/2}$ al inicio del proceso de adsorción ($\theta = 0,5$ s) podría considerarse como una constante de velocidad de difusión aparente (k_{dif}^a) (Perez y col., 2009).

El efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-1,0 %p/p) sobre el valor de k_{dif}^a del WPC se presenta en la Figura 5.15A. En dicha Figura se adicionó el valor de k_{dif}^a del WPI. Se observó que el valor de k_{dif}^a del WPC fue superior al del WPI. A la misma concentración de proteína en solución (1,0 %p/p), las diferencias en k_{dif}^a podrían atribuirse a diferencias en composición, agregación y/o existencia de impurezas superficialmente activas en la muestra de WPC.

Por otro lado, se observó que la presencia de PS afectó la magnitud de k_{dif}^a del WPC dependiendo del tipo de PS y de su concentración relativa en la subfase acuosa. Además, los PS ejercieron el mismo efecto sobre el valor de π a largos θ ($\pi_{10.800}$), tal como puede apreciarse en la Figura 5.14. Este resultado indicaría que, en los sistemas WPC/PS, los mismos factores que afectarían a la difusión del WPC hacia la interfase aire-agua también podrían impactar sobre la dinámica de formación de la película adsorbida a largos θ (Figura 5.15B).

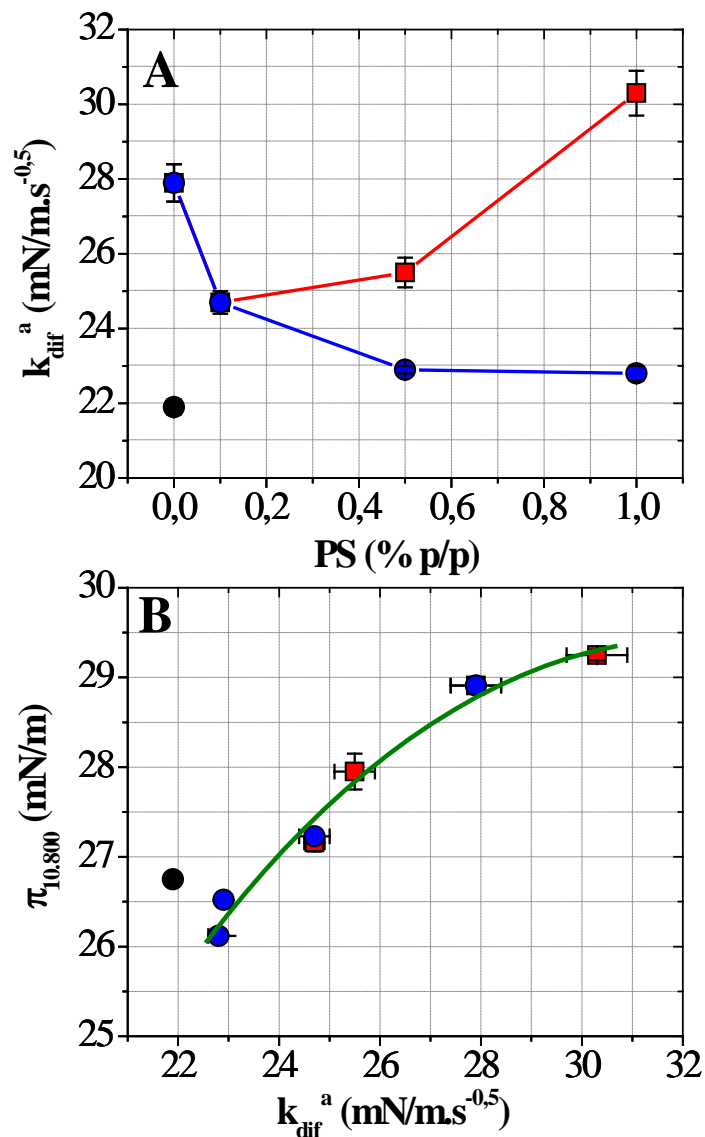


Figura 5.15. Efecto de la concentración de PS sobre (a) la constante de velocidad de difusión aparente (k_{diff}^a) y (b) Relación entre la constante de velocidad de difusión aparente (k_{diff}^a) y la presión superficial a los 10.800 s de adsorción (π_{10800}) para las películas de los sistemas (□) WPC/AS y (○) WPC/ λ -C) sobre la interfase aire-agua. Concentración de WPC 1,0% p/p, temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05 M. Los valores de (●) k_{diff}^a y π_{10800} para el WPI son incluidos como referencias.

El comportamiento difusivo del WPC en presencia de los PS se explica a continuación:

(i) El aumento de la concentración de AS en los sistemas WPC/AS provocó una disminución (a nivel de 0,1-0,5 %p/p) y luego un incremento en el valor de k_{dif}^a del WPC (Figura 5.15A). A bajas concentraciones de AS, la reducción del valor de k_{dif}^a podría explicarse sobre la base de una resistencia del WPC a la difusión debido a la existencia de fenómenos segregativos en la subfase acuosa de los sistemas mixtos con agregación de la proteína y reducción de S_0 (como también puede deducirse a partir de las Figuras 5.3 y 5.9). Por otra parte, a la mayor concentración de AS evaluada (1,0 %p/p), el aumento del valor de k_{dif}^a del WPC podría relacionarse con un incremento de la actividad superficial del WPC debido a una mayor exposición de grupos hidrofóbicos expuestos como consecuencia de la elevada repulsión electrostática entre los biopolímeros en la subfase acuosa (Pavlovskaya y col., 1993; Uruakpa y Arntfield, 2006). Como esta situación sería termodinámicamente desfavorable, el sistema tendería a disminuir el contacto entre los sitios hidrofóbicos superficiales del WPC y la subfase acuosa por efecto hidrofóbico (Grinberg y Tolstoguzov, 1997) potenciando su velocidad de difusión hacia la interfase y provocando un mayor valor de la presión superficial de la película a largos θ (como puede deducirse a partir de la Figura 5.15B).

(ii) El aumento de la concentración de λ -C en los sistemas WPC/ λ -C provocó una disminución gradual del valor de k_{dif}^a del WPC (Figura 5.15A). Este comportamiento podría explicarse considerando una resistencia a la difusión del WPC y/o a una menor disponibilidad de la proteína para su adsorción debido a la formación de complejos electrostáticos solubles WPC- λ -C en la subfase acuosa. La formación de

complejos biopoliméricos podría afectar la adsorción de la proteína como consecuencia de una menor velocidad de difusión hacia la interfase aire-agua (Ganzevles y col., 2006).

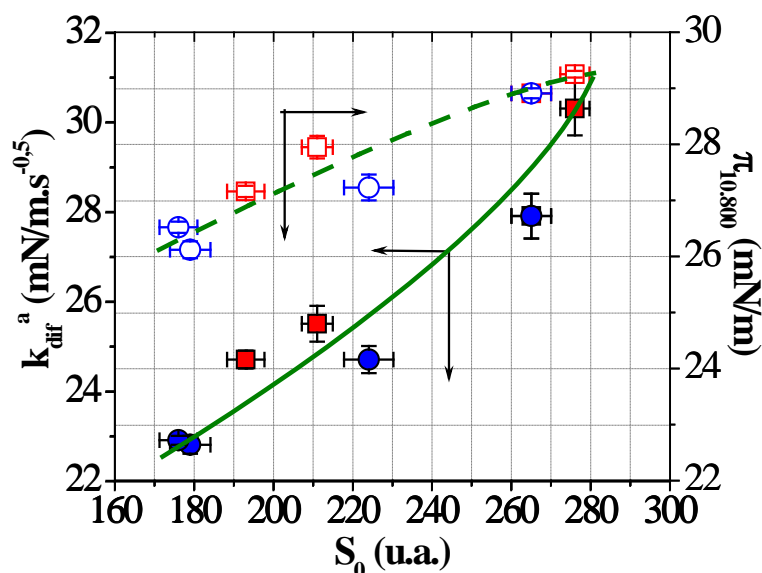


Figura 5.16. Relación entre la hidrofobicidad superficial (S_0) con la velocidad de difusión aparente (k_{dif}^a) (símbolos abiertos) y con la presión superficial a los 10.800s de adsorción (π_{10800}) (símbolos rellenos) para los sistemas mixtos (\square, \blacksquare) WPC/AS y (\circ, \bullet) WPC/ λ -C). Concentración de WPC 1,0 % p/p, temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05 M.

(iii) En general, se observó la existencia de una relación entre los valores de k_{dif}^a y $\pi_{10.800}$ y los valores de S_0 de los sistemas mixtos. Estas relaciones se presentan en la Figura 5.16. A partir de la misma podría deducirse que los factores que promueven bajos valores de S_0 , tales como la formación de complejos solubles WPC-PS y/o la segregación con agregación de la proteína en la subfase acuosa, provocarían una disminución en la velocidad de difusión del WPC; mientras que, los factores que promueven elevados valores de S_0 , tales como la elevada exposición de segmentos

hidrofóbicos de la proteína debido a la elevada repulsión electrostática entre los biopolímeros provocarían un incremento en la velocidad de difusión del WPC hacia la interfase aire-agua. Por lo tanto, se podría concluir que distintas interacciones macromoleculares entre el WPC y los PS en la subfase acuosa de los sistemas mixtos podrían ejercer una importante influencia sobre la magnitud del paso de difusión del WPC hacia la interfase aire-agua y consecuentemente, en la formación de la película interfacial. Los efectos termodinámicos de la hidrofobicidad expuesta sobre el transporte difusional de proteínas y su afinidad hacia la interfase aire-agua, han sido discutidos ampliamente en la bibliografía (Damodaran, 2004).

Penetración y reordenamiento a nivel de la interfase aire-agua

La formación de una película interfacial de proteína depende fuertemente de la velocidad a la que las macromoléculas se adsorben, penetran y sufren reordenamientos e interacciones entre los segmentos adsorbidos, lo que también determina las propiedades mecánicas de la película frente a deformaciones interfaciales que tienen lugar durante la formación y estabilidad de espumas. Como se mencionó en la Sección 3.2.2.2, a largos θ , luego de un periodo controlado por la difusión, existe una barrera de energía para la adsorción de la proteína atribuida a la adsorción, penetración, desplegamiento y reordenamientos de los segmentos adsorbidos sobre la interfase aire-agua (Rodríguez Patino y col., 1999; Baeza y col., 2005). Las constantes de penetración y reordenamiento pueden determinarse a través de la medición de la evolución temporal de π (Sección 4.3.3.2) y posterior ajuste de los datos experimentales al modelo cinético

de primer orden dado por la Ecuación 4.6 (Graham y Phillips, 1979; Suttiprasit y col., 1992). La aplicación de la Ecuación 4.6 para la adsorción interfacial a largos θ del WPC y los sistemas WPC/PS se presenta en la Figura 5.17.

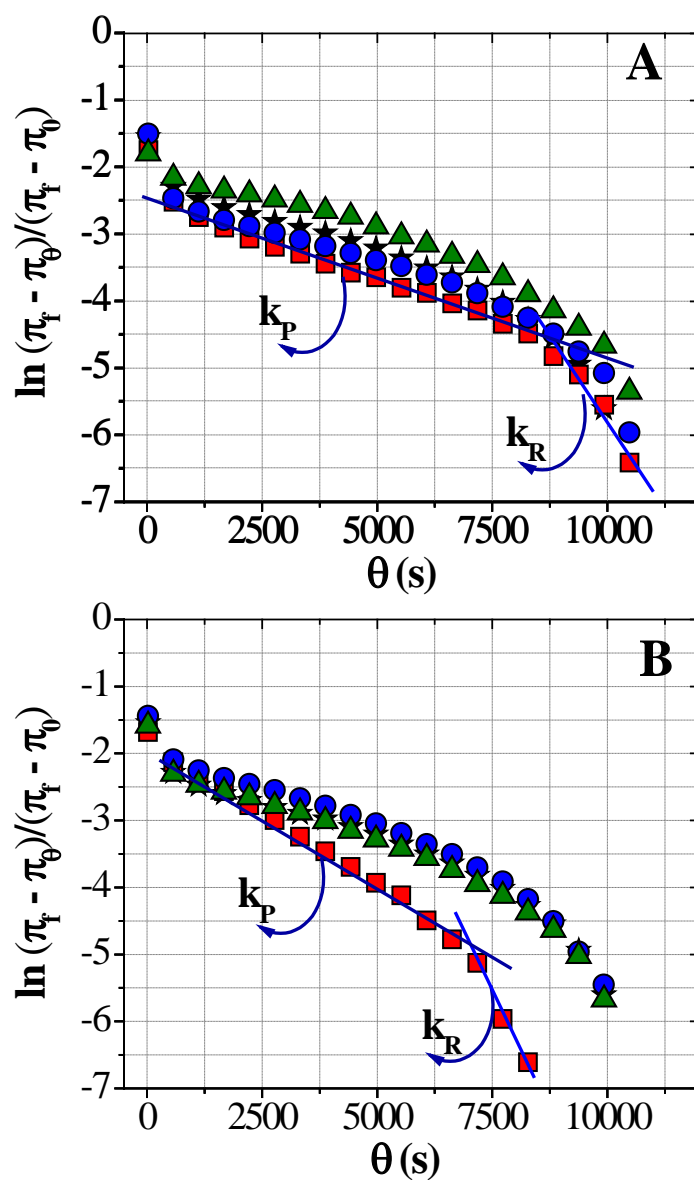


Figura 5.17. Efecto de los PS sobre los mecanismos de penetración molecular y reordenamiento configuracional sobre la interfase aire-agua del WPC. (A) Sistemas WPC/AS, (B) Sistemas WPC/ λ -C. Símbolos sistemas Prot:PS: (\star) 1,0:0,0 %p/p, (\blacksquare) 1,0:1,0 %p/p, (\bullet) 1,0:0,5 %p/p, (\blacktriangle) 1,0:0,1 %p/p. Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05 M.

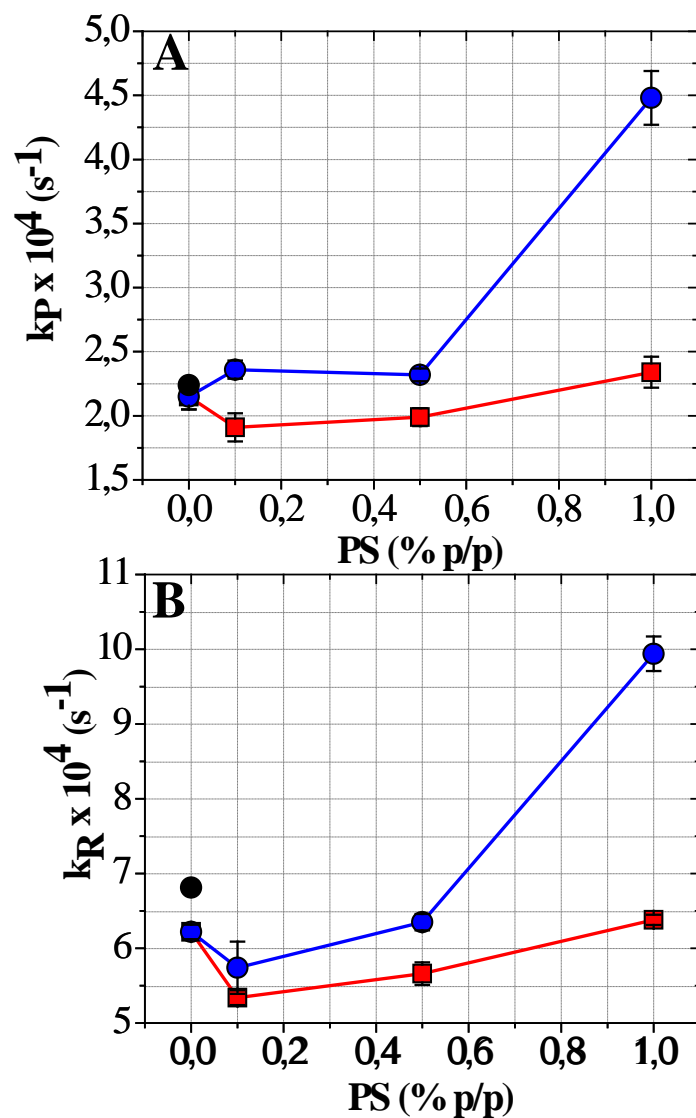


Figura 5.18. Efecto de la concentración de PS sobre (A) la constante de velocidad de penetración aparente (k_p) y (B) la constante de velocidad de reordenamiento configuracional (k_R) del WPC. Símbolos: (□) WPC/AS y (○) WPC/ λ -C. Concentración de WPC 1,0% p/p, temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05 M. Los valores de los parámetros cinéticos del WPI (●) son incluidos como una referencia.

De acuerdo al modelo cinético empleado, el valor de la pendiente inicial correspondería a la constante de velocidad de penetración (k_p), mientras que el valor de

la segunda pendiente sería la constante de velocidad de reordenamiento configuracional (k_R) de los segmentos de WPC adsorbidos. Se observó que el modelo cinético fue adecuado para describir la magnitud de los mecanismos de adsorción a largos θ ya que en todos los casos el coeficiente de correlación (R) fue superior a 0,970.

La Figura 5.18 presenta el efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-1,0 %p/p) sobre la magnitud de los valores de k_P y k_R del WPC. En dicha Figura se incluyeron los valores de k_P y k_R del WPI. Se observó que los valores de k_P para WPC y WPI fueron similares, mientras que el valor de k_R del WPC fue más bajo que el valor de k_R del WPI. Este resultado se debería a la existencia de una fracción desnaturalizada (agregada) en la muestra del WPC. Los agregados de proteína son resistentes a los procesos de desplegamiento y reordenamiento que normalmente tienen lugar en el entorno interfacial (Murray y Ettelaie, 2004).

Por otro lado, se observó que la presencia de PS afectó la magnitud de k_P y k_R del WPC dependiendo del tipo de PS y de su concentración relativa en la subfase acuosa. A partir de la Figura 5.18 puede deducirse que:

(i) El aumento de la concentración de AS en los sistemas WPC/AS provocó una disminución (a nivel de 0,1-0,5 %p/p) y luego un incremento de los valores de k_P y k_R . A menores concentraciones de AS, la reducción en los valores de k_P y k_R podría explicarse en términos de una menor disponibilidad del WPC para su adsorción interfacial debido a una menor velocidad de difusión (Figura 5.15A). En presencia de AS, la existencia de fenómenos segregativos con agregación del WPC podría retardar los procesos de penetración, desplegamiento y reordenamiento de los segmentos adsorbidos sobre la interfase aire-agua. Además se observó que en estas condiciones, los valores de k_P y k_R de dichos sistemas alcanzaron valores similares a los del WPI.

Este resultado, indicaría que pequeñas cantidades de AS podrían promover la adsorción preferencial de la β -LG nativa del WPC, mientras que la fracción desnaturalizada (agregada) estaría involucrada en fenómenos segregativos de la subfase acuosa. Sin embargo, la confirmación de esta hipótesis requeriría la realización de estudios interfaciales y moleculares adicionales.

(ii) Por otra parte, a la mayor concentración de AS evaluada (1,0 %p/p), el aumento en los valores de k_P y k_R podría relacionarse con una mayor disponibilidad del WPC para su adsorción interfacial debido a una elevada velocidad de difusión (Figura 5.15A). De esta manera, la mayor exposición de grupos hidrofóbicos expuestos como consecuencia de la elevada repulsión entre los biopolímeros en la solución podría favorecer la velocidad de penetración y reordenamiento configuracional del WPC.

(iii) En general, el aumento de la concentración de λ -C en los sistemas WPC/ λ -C provocó un incremento gradual de los valores de k_P y k_R . Además, se observó que los valores de k_P y k_R de los sistemas WPC/ λ -C fueron superiores a los observados en los sistemas WPC/AS. Para estos últimos sistemas, los valores de k_P y k_R de fueron explicados en términos del comportamiento de difusión del WPC hacia la interfase debido a que podría determinar su disponibilidad para la adsorción interfacial. Sin embargo, el comportamiento difusivo observado en los sistemas WPC/ λ -C no podría explicar por si mismo los valores de k_P y k_R obtenidos. Probablemente existan otros factores que determinarían la velocidad de penetración y reordenamiento del WPC en presencia de λ -C. Dichos factores podrían relacionarse con la formación de complejos electrostáticos solubles WPC- λ -C en la subfase acuosa (Ganzevles y col., 2006).

(iv) En todos los casos, se observó que los valores de k_P fueron menores a los de k_R , lo que sugeriría que el paso de penetración sería la etapa limitante del proceso de adsorción interfacial tanto para el WPC puro como para los sistemas WPC/PS.

5.1.2.4. Efecto de los PS sobre las propiedades dilatacionales superficiales de las películas de WPC

Como se mencionó en la Sección 3.2.3, la viscoelasticidad dilatacional superficial de las películas de proteínas adsorbidas sobre la interfase aire-agua constituye uno de los factores más relevantes en la determinación de la estabilidad de espumas. Además, la reología dilatacional superficial es de gran interés debido a su extrema sensibilidad a la fuerza y naturaleza de las interacciones macromoleculares que tienen lugar a nivel de interfases fluidas (Rodríguez Patino y Rodríguez Niño, 1999; Rodríguez Patino y col., 2007a).

La evolución temporal de los parámetros reológicos dilatacionales superficiales (E , E_d y ϕ) de las películas de WPC y WPI a concentración en solución de 1,0 %p/p se presentan en la Figura 5.19. Se observó que los valores de E y E_d aumentaron y que los valores de ϕ disminuyeron con el tiempo (θ), un fenómeno que podría ser asociado con la adsorción de las proteínas sobre la interfase aire-agua y/o con el incremento de la resistencia mecánica de la película frente a la deformación dilatacional (Graham y Phillips, 1979; Damodaran y Song, 1988).

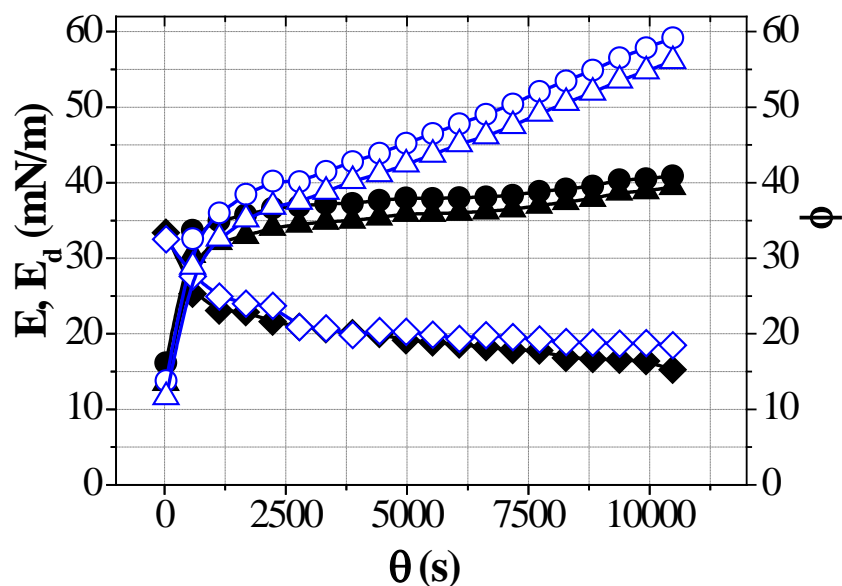


Figura 5.19. Evolución temporal del módulo dilatacional superficial, (○) E (mN/m), su componente elástica, (△) E_d (mN/m), y el ángulo de fase, (◇) (ϕ) para las películas de WPC (símbolos rellenos), para las películas de WPI adsorbidos sobre la interfase aire-agua (símbolos abiertos). Amplitud de deformación ($\Delta A/A$) 10 %, Frecuencia angular (ω) 100 mHz, Concentración de proteína 1,0% p/p, Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05M.

Además, se observó que: (i) los valores de E y E_d fueron similares y (ii) que los valores de ϕ fueron relativamente más bajos. Los sistemas WPC/PS a diferentes concentraciones de PS en la subfase acuosa se comportaron de una manera similar (como puede deducirse a partir de las Figuras A2.1 y A2.2. del Apéndice II). Por lo tanto, como consecuencia de este comportamiento, se podría concluir que las características viscoelásticas superficiales del WPC, WPI y de los sistemas WPC/PS fueron esencialmente elásticas a nivel de la frecuencia angular (ω) aplicada (100 mHz) y especialmente a largos θ . Se observó que a cortos θ los valores de E_d de las películas de WPC y WPI fueron similares. Así, aunque la velocidad de difusión del WPI es

mucho menor a la del WPC (Figura 5.15A), la elasticidad dilatacional superficial para estas proteínas al inicio del proceso de adsorción es similar. Sin embargo, a largos θ , los valores de E_d para el WPI fueron más altos que los del WPC. Este comportamiento podría ser asociado con la presencia de impurezas superficialmente activas en la muestra de WPC, las que podrían reducir el número de interacciones macromoleculares entre los segmentos de WPC adsorbidos.

La Figura 5.20 presenta el efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-1,0 %p/p) sobre la evolución temporal de E_d de la película adsorbida de WPC sobre la interfase aire-agua. En esta Figura, se adicionaron los valores de E_d de la película adsorbida de WPI nuevamente como una referencia. Se observó que la magnitud de los valores de E_d dependió del tipo de PS, de su concentración relativa en la subfase acuosa y de θ . Se observó que la adición de AS a una concentración de 1,0 %p/p produjo un incremento de los valores de E_d del sistema mixto comparado con los valores de E_d del WPC puro (Figura 5.20A). Este comportamiento podría ser relacionado con una rápida difusión de la proteína hacia la interfase aire-agua y/o con un incremento en el número de interacciones entre los segmentos adsorbidos (Rodríguez Patino y col., 1999). Sin embargo, la adición de λ -C a una concentración de 1,0 %p/p produjo una reducción en los valores de E_d a cortos θ comparado con el WPC puro (Figura 5.20B). Este comportamiento podría vincularse con una menor disponibilidad del WPC para su adsorción interfacial debido a la menor velocidad de difusión que presentó el sistema debido a la formación de complejos electrostáticos WPC- λ -C en la subfase acuosa.

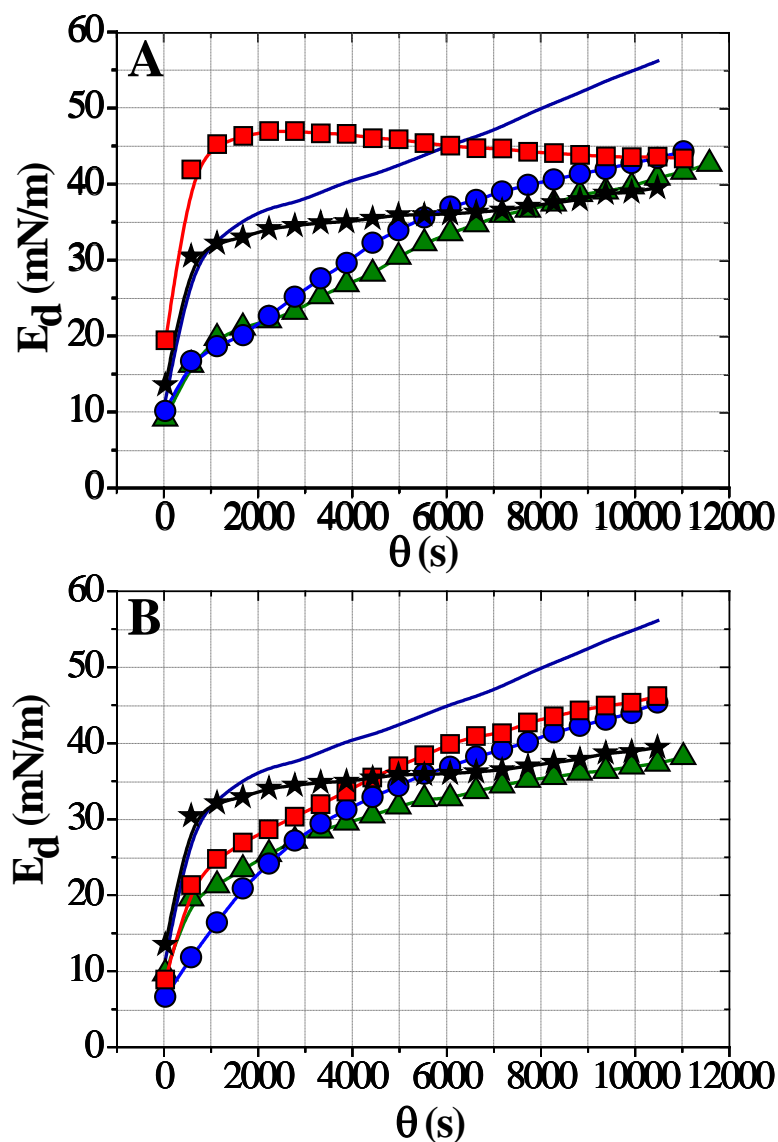


Figura 5.20. Efecto de la concentración de PS sobre la evolución temporal de la elasticidad dilatacional (E_d , mN/m) de las películas de WPC adsorbido sobre la interfase aire-agua. (A) Sistemas WPC/AS, (B) Sistemas WPC/ λ -C. Símbolos sistemas Prot:PS: (★) 1,0:0,0 %p/p, (■) 1,0:1,0 %p/p, (●) 1,0:0,5 %p/p, (▲) 1,0:0,1 %p/p. Amplitud de deformación ($\Delta A/A$) 10 %, Frecuencia angular (ω) 100 mHz, Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05M. Datos para la película de WPI incluida como referencia (—).

A bajas concentraciones, se observó que el efecto de los PS sobre los valores de E_d de los sistemas WPC/PS dependió fuertemente de θ (Figura 5.20). A cortos θ , los

valores de E_d para los sistemas mixtos fueron, en general, más bajos que los valores de E_d para el WPC puro. Estos resultados confirmarían que la segregación con agregación del WPC en los sistemas WPC/AS y/o la formación de complejos solubles en la subfase acuosa de los sistemas WPC/ λ -C, podrían reducir el número de interacciones macromoleculares entre los segmentos adsorbidos de WPC. Sin embargo, a largos θ , los valores de E_d para los sistemas mixtos fueron elevados o similares a los del WPC puro. Además, estos resultados sugerirían que las interacciones macromoleculares en el entorno de la interfase aire-agua entre los segmentos adsorbidos de WPC podrían incrementar gradualmente con θ y con el aumento de la concentración relativa de PS en la subfase acuosa. En general, este comportamiento se halló consistente con los valores de k_P y k_R para los sistemas WPC/PS discutidos en la sección previa.

5.1.2.5. Efecto de los PS sobre la estructuración interfacial del WPC

Comúnmente, el modulo dilatacional superficial se considera una medida de la resistencia mecánica total de una película de proteína frente a la deformación dilatacional de la interfase aire-agua (Bos y van Vliet, 2001; Rodríguez Patino y col., 2007a).

En el caso de proteínas globulares, los valores de E incrementan con π sugiriendo un aumento en el número de interacciones macromoleculares entre segmentos adsorbidos de proteína (Rodríguez Patino y col., 1999, 2003). Además, todos los datos de E podrían normalizarse en una sola curva maestra $E-\pi$ la cual sería característica de cada proteína.

El efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-1,0 %p/p) sobre la dependencia de E con π para la película de WPC adsorbido sobre la interfase aire-agua se presenta en la Figura 5.21. En esta Figura se adicionó la curva maestra $E-\pi$ para una película de WPI. En general, se observó que:

(i) Las pendientes de estas curvas fueron mayores a uno (representado por la línea sólida en la Figura 5.21) sugiriendo la existencia de un comportamiento no ideal de las películas (Lucassen Reynders y col., 1975) gobernado por un gran número de interacciones macromoleculares entre segmentos adsorbidos sobre la interfase aire-agua (Rodríguez Patino y col., 1999).

(ii) Las curvas $E-\pi$ de todas las películas no se normalizaron en una única curva indicando que las proteínas se adsorberían con diferentes grados de estructuración (empaquetamiento) y/o condensación de segmentos adsorbidos sobre la interfase aire-agua (Rodríguez Patino y col., 2003; Miñones Conde y Rodríguez Patino, 2005) dependiendo del tipo de proteína (WPC o WPI), del tipo de PS (AS o λ -C) y de su concentración en la subfase acuosa.

(iii) En el rango global de π los valores de E de la película adsorbida de WPI fueron más elevados que los del WPC y de los sistemas WPC/PS (Figura 5.21) sugiriendo que la materia grasa residual, los agregados proteicos del WPC y las distintas interacciones entre los biopolímeros en los sistemas mixtos podrían reducir el número de interacciones entre sus segmentos adsorbidos (como puede deducirse a partir de los valores de E_d para WPC, WPI y para los sistemas WPC/PS en la Figura 5.20).

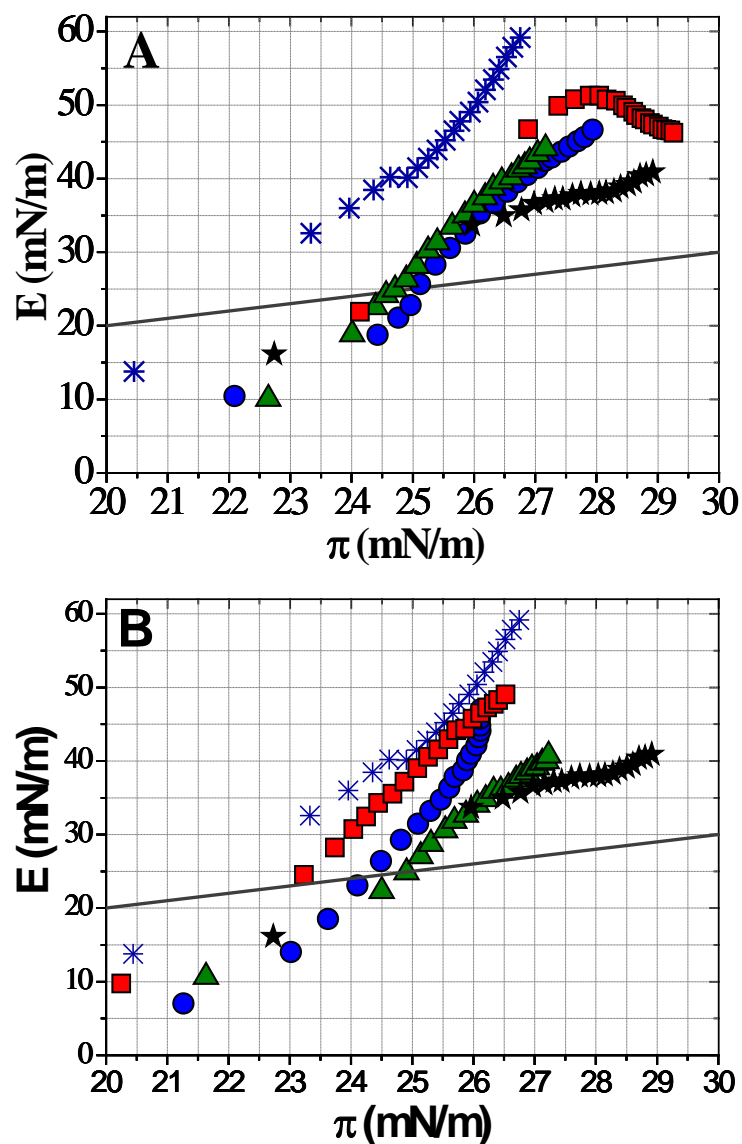


Figura 5.21. Efecto de la concentración de PS sobre la estructuración interfacial (representada por la curva máster $E-\pi$) de las películas de WPC adsorbido sobre la interfase aire-agua. (A) Sistemas WPC/AS, (B) Sistemas WPC/ λ -C. Símbolos sistemas Prot:PS: (★) 1,0:0,0 %p/p, (■) 1,0:1,0 %p/p, (●) 1,0:0,5 %p/p, (▲) 1,0:0,1 %p/p. Amplitud de deformación ($\Delta A/A$) 10 %, Frecuencia angular (ω) 100 mHz, Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05M. Datos para la película de WPI incluida como referencia (*).

(iv) En el sistema mixto WPC/AS a 1,0 %p/p de AS en la subfase acuosa, los valores de E alcanzaron un valor máximo a nivel de $\pi \approx 28$ mN/m a partir del cual los valores de E disminuyeron (Figura 5.21A). Este valor de π podría ser considerado como un valor de presión superficial crítico (π_c) en dicho sistema. Además, se observó que este valor de π_c estuvo por debajo del valor de “pseudoequilibrio” para la película adsorbida de WPC (29 mN/m) (como puede deducirse a partir de la Figura 5.14). Por lo tanto, a $\pi > \pi_c$ podría tener lugar el colapso de la película adsorbida de WPC sobre la interfase aire-agua. Este comportamiento podría asociarse con una transición en el comportamiento viscoelástico de la película de WPC favorecido por la formación de multicapas adsorbidas sobre la interfase aire-agua (Bos y van Vliet, 2001). La formación de multicapas podría ser promovida por la rápida difusión de las macromoléculas de WPC en presencia de AS a concentración de 1,0% p/p (Figura 5.15A), lo que podría saturar rápidamente la interfase aire-agua. La rápida saturación de la interfase podría ser consistente con los elevados valores de E_d registrados a cortos θ en el sistema mixto. Luego, el elevado número de interacciones entre segmentos de WPC adsorbidos podría resultar en la formación de multicapas, llevando al colapso de la película interfacial. Esta observación fue también consistente con los valores de E_v registrados a largos θ (como puede deducirse a partir de la Figura A2.1 del Apéndice II). Cuando la concentración de AS se redujo en la subfase acuosa, los sistemas WPC/AS alcanzaron un valor máximo de E en un rango de $\pi < \pi_c$, indicando la ausencia de un fenómeno de colapso.

(v) La estructuración interfacial de los sistemas WPC/ λ -C fue diferente a la de los sistemas WPC/AS (Figura 5.21B). El incremento de la concentración de λ -C

produjo el desplazamiento de las curvas $E-\pi$ hacia menores valores de π respecto del WPC puro. Además, en ninguno de estos sistemas mixtos se observó un fenómeno de tipo colapso. La existencia de multicapas adsorbidas en los sistemas WPC/ λ -C también podría explicar los resultados observados (como puede deducirse a partir de la Figura A2.2 del Apéndice II). Sin embargo, en contraste con los sistemas WPC/AS, el aumento de la concentración de λ -C en la subfase acuosa, podría prevenir el colapso de la película adsorbida de WPC a través de un estrecho empaquetamiento de segmentos adsorbidos. Esta observación sería consistente con los elevados valores de k_R obtenidos para los sistemas WPC/ λ -C comentados y discutidos en secciones previas.

El ángulo de fase (ϕ) entre el esfuerzo y la deformación dilatacional podría considerarse como una medida de la viscoelasticidad relativa de las películas de proteína adsorbida sobre la interfase aire-agua.

Las curvas $\phi-\pi$ para las películas de WPC puro y de los sistemas WPC/PS como una función de la concentración de PS se muestra en la Figura 5.22. En esta Figura se adicionó la curva $\phi-\pi$ de una película de WPI. Se observó una disminución de los valores de ϕ con el incremento de los valores de π de las películas. Este comportamiento sugeriría un aumento de la viscoelasticidad relativa de las películas (aumento del carácter elástico) como una consecuencia de la adsorción interfacial de las proteínas y del incremento en el número de interacciones macromoleculares de los segmentos adsorbidos. Además, se observó que la película de WPI fue más viscoelástica que la de WPC lo que confirmaría la hipótesis acerca de la influencia de impurezas superficialmente activas y/o de los agregados del WPC sobre las propiedades mecánicas

(disminución de la elasticidad) de las películas (como también puede deducirse a partir de las Figuras 5.20 y 5.21).

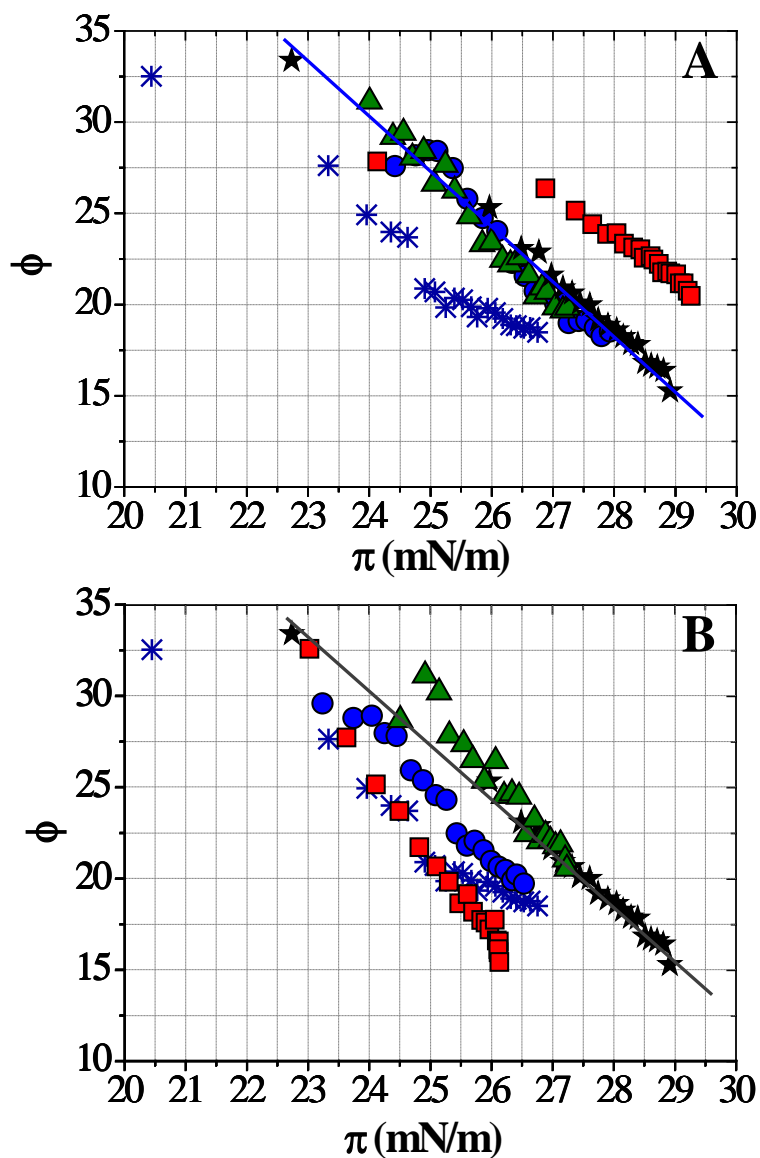


Figura 5.22. Efecto de la concentración de PS sobre el ángulo de fase, ϕ , como una función de la presión superficial, π , de las películas de WPC (curvas ϕ - π). (A) Sistemas WPC/AS, (B) Sistemas WPC/ λ -C. Símbolos sistemas Prot:PS: (★) 1,0:0,0 %p/p, (■) 1,0:1,0 %p/p, (●) 1,0:0,5 %p/p, (▲) 1,0:0,1 %p/p. Amplitud de deformación ($\Delta A/A$) 10 %, Frecuencia angular (ω) 100 mHz, Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05M. Datos para la película de WPI incluida como referencia (*).

Por otro lado, a partir de dichas curvas, podrían observarse dos regiones de diferente viscoelasticidad relativa tomando como referencia la curva $\phi-\pi$ de la película adsorbida de WPC: (a) una región de menor viscoelasticidad (por arriba de la curva del WPC puro) y (b) otra región de mayor viscoelasticidad (por debajo de la curva para el WPC puro). De esta manera, podría compararse la viscoelasticidad relativa de los sistemas WPC/PS de acuerdo al tipo de PS y su concentración en la subfase acuosa. Se observó que bajas concentraciones de PS, produjeron películas con similares o levemente inferiores características viscoelásticas que la película de WPC puro adsorbido sobre la interfase aire-agua.

Para los sistemas WPC/AS, se observó que a la mayor concentración de AS en la subfase acuosa (1,0 %p/p) hubo un desplazamiento de la curva $\phi-\pi$ hacia regiones de menor viscoelasticidad, indicando una reducción de las características viscoelásticas de la película de WPC adsorbida (Figura 5.22A). Por el contrario, para los sistemas WPC/ λ -C, el incremento gradual en la concentración de λ -C produjo un desplazamiento de las curvas $\phi-\pi$ hacia regiones de mayor viscoelasticidad, sugiriendo un mejor control de las propiedades viscoelásticas de la película de WPC (Figura 5.22B).

En resumen, la dinámica de formación de películas de WPC a nivel de la concentración de saturación interfacial fue modificada por interacciones macromoleculares entre el WPC y los PS, tanto en la subfase acuosa como en el entorno de la interfase aire-agua. Tales interacciones tuvieron un fuerte impacto sobre la cinética de adsorción, las características viscoelásticas de las películas y estructuración interfacial del WPC dependiendo de la estructura química del PS, de su concentración relativa en los sistemas mixtos y del tiempo de adsorción.

5.1.3. Efecto de la adición de polisacáridos sobre las propiedades espumantes del WPC

En el presente estudio, se observó que tanto las dispersiones acuosas de PS como la dispersión de WPC al 1,0 %p/p (concentración en el seno de solución que permite la saturación de la interfase aire-agua) no produjeron una espuma verdadera con el dispositivo experimental empleado. Las espumas de PS no serían posibles debido a que son biopolímeros no superficialmente activos incapaces de adsorberse y de generar una película adsorbida sobre la interfase aire-agua. Sin embargo, a pesar de su naturaleza anfifílica, se observó que la dispersión de WPC no formó una columna de espuma suficiente para alcanzar los 120 ml requeridos para la determinación de sus propiedades espumantes. Bajo estas condiciones, se observó que la formación de las espumas de WPC estuvo simultáneamente acompañada por la ruptura de las mismas. Por lo tanto, considerando que el WPC fue capaz de adsorberse sobre la interfase aire-agua formando una película adsorbida con propiedades mecánicas mensurables (tal como ha sido discutido en secciones previas), la pobre capacidad espumante del WPC fue vinculada principalmente con la presencia de un alto contenido de grasa residual (8,0 %p/p) en la muestra.

Por otro lado, en contraste con el pobre comportamiento espumante del WPC, se observó que la dispersión acuosa de WPI a la misma concentración en el seno de solución (1,0 %p/p) presentó una mejor capacidad espumante.

En la literatura científica existen muchos reportes acerca de la existencia de una pobre capacidad espumante de muestras industriales de WPC atribuida a la presencia de un elevado contenido de grasa residual. De hecho, se conoce que la mayoría de los

lípidos, tales como los ácidos grasos, fosfolípidos, lípidos neutros, colesterol, triglicéridos, diacilglicerol, etc. (excepto monoacilglicéridos) se correlacionan negativamente con las propiedades espumantes de muestras de WPC (Vaghela y Kilara, 1996). En el intento de solucionar estos problemas se ha sugerido que la eliminación de la grasa (incluyendo las membranas de los glóbulos de grasa) por pretratamientos del suero líquido y/o la transformación de la misma, por tratamiento enzimático con lipasas, en lípidos menores (mono y diacilglicéridos, entre otros compuestos) podría mejorar sustancialmente la capacidad espumante de muestras industriales de WPC (Vaghela y Kilara, 1996; Huffman y Harper, 1999; Karleskind y col., 1995; Blecker y col., 1997; Zhu y Damodaran, 1994).

El presente trabajo de investigación propone una estrategia diferente para mejorar la capacidad espumante de una muestra industrial de WPC, la que consiste en la adición de PS no superficialmente activos, tales como AS y λ -C. Dicha estrategia se halla soportada por una serie de estudios previos los que han demostrado que la adición de PS a dispersiones acuosas de proteínas podrían tener un efecto sinérgico sobre las propiedades espumantes de las mismas dependiendo de la estructura química de los PS, de su concentración relativa y de las distintas interacciones macromoleculares entre los biopolímeros (Syrbe y col., 1998; Dickinson, 2003; Ganzevles y col., 2006; Makri y col., 2007).

En las siguientes Secciones, el efecto de la adición de PS sobre la formación y estabilidad de espumas de WPC será discutido en términos de la fuerza y naturaleza de las interacciones entre el WPC y los PS tanto en la subfase acuosa como en el entorno de la interfase aire-agua de los sistemas mixtos.

5.1.3.1. Efecto de los PS sobre la formación de espumas de WPC

El efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-1,0 %p/p) sobre la formación de espumas de WPC, caracterizada por los parámetros: capacidad espumante global, OFC (ml/s) y conductividad relativa, C_f (%), como una medida de la densidad y retención de líquido de las espumas, se presenta en la Figura 5.23. Para establecer comparaciones, en dicha Figura se incluye la evolución de OFC del WPI con la concentración de PS.

La magnitud de los valores de OFC y de C_f de los sistemas WPC/PS aumentaron dependiendo del tipo de PS y de su concentración en solución, indicando la existencia de un efecto sinérgico de los PS sobre la formación de espumas de WPC. Particularmente, se observó que:

(i) La adición de λ -C mejoró la capacidad espumante del WPC (aumento de los valores de OFC y C_f) produciendo un efecto superior (Figura 5.23B) al producido por el agregado de AS (Figura 5.23A). A nivel de la más alta concentración de λ -C evaluada (1,0 %p/p), el elevado valor de C_f indicaría la formación de burbujas más pequeñas y más densas. Como se discutirá más adelante, las diferencias observadas en la magnitud de los parámetros de formación de espumas, podrían ser atribuidas al diferente comportamiento de interacción de los sistemas WPC/PS tanto en el seno de solución como en el entorno de la interfase aire-agua. Además, cabe destacar que la adición de una pequeña cantidad de λ -C (0,1 %p/p) al WPC fue necesaria para alcanzar los mismos valores de OFC que el WPI puro, lo que podría tener una gran significancia desde un punto de vista práctico.

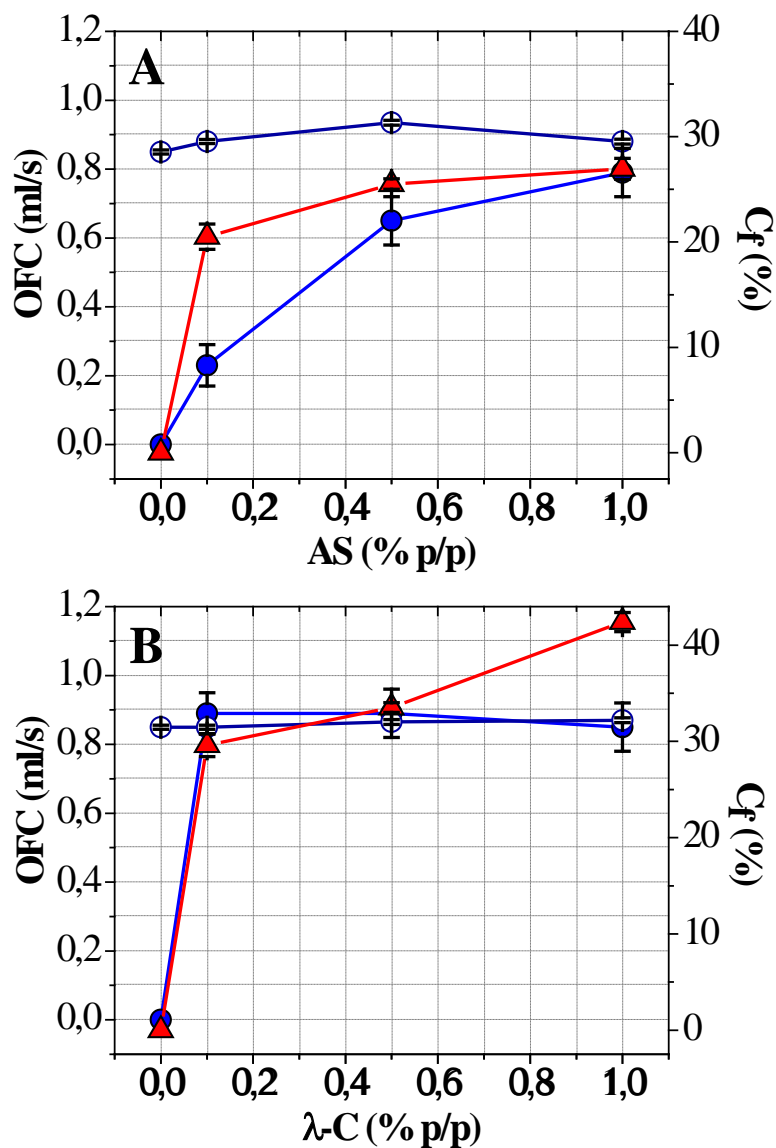


Figura 5.23: Efecto de la concentración de PS (en el rango de concentración de 0,0-1,0 %) sobre los parámetros de formación de espumas de WPC: capacidad espumante global, OFC (ml/s) (●) y conductividad relativa, C_r (%) (▲). (A) Sistemas WPC/AS. (B) Sistemas WPC/λ-C. Se incluye la evolución de OFC del WPI con la concentración de PS (○) como una referencia. Concentración de proteína 1,0 % p/p, temperatura 20 °C, pH 7 y I 0,05 M.

(ii) La adición de los PS a la dispersión de WPI, prácticamente no provocó cambios en el valor de OFC de los sistemas WPI/PS, al menos en el rango de concentración de biopolímeros evaluada. Las propiedades espumantes del WPI en presencia de los PS se profundizarán y discutirán en próximas secciones de la presente Tesis.

Relación entre la formación de espumas y las características interfaciales a cortos θ

Si la capacidad espumante del WPC en los sistemas mixtos dependiera de la velocidad de adsorción interfacial (Carrera Sánchez y Rodríguez Patino, 2005), los parámetros de formación de espumas podrían tener alguna relación con el primer paso del mecanismo de adsorción del WPC (difusión hacia la interfase) y con el desarrollo de una película viscoelástica interfacial. Las propiedades reológicas dilatacionales superficiales poseen una gran relevancia y relación con los mecanismos de formación de espumas debido a la existencia de movimientos de compresión y expansión que sufre la interfase durante el fenómeno de espumado (Murray, 2002; Rodríguez Patino y col., 2003).

Para comprobar esta hipótesis, el parámetro OFC de los sistemas WPC/PS fue relacionado con la constante de velocidad de difusión aparente de la proteína (k_{dif}^a) y con la elasticidad dilatacional inicial (E_{di} , a los 0,5 s de adsorción interfacial) de las películas adsorbidas sobre la interfase aire-agua. Estas relaciones se presentan en la Figura 5.24. Se observó que:

(i) Los valores de OFC de los sistemas WPC/AS aumentaron con el incremento de los valores de k_{dif}^a y de E_{di} . Este comportamiento sugeriría que un

aumento de la velocidad de difusión y un incremento del carácter elástico inicial de las películas interfaciales podrían explicar el incremento de la capacidad espumante global de los sistemas WPC/AS.

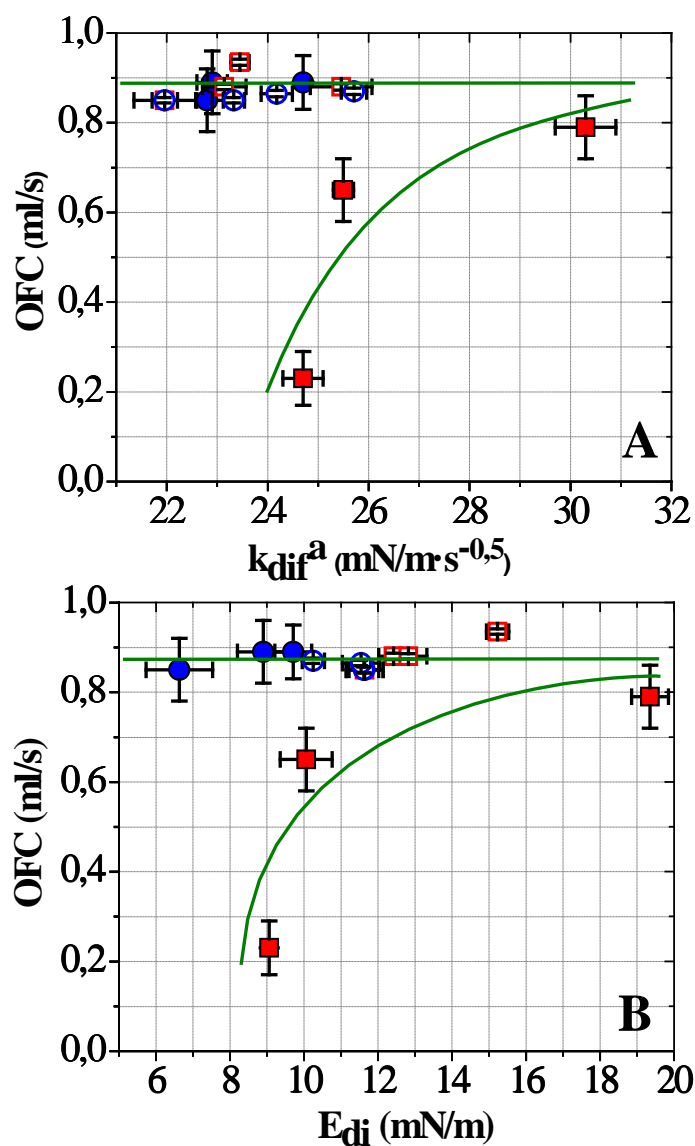


Figura 5.24. Efecto de la velocidad difusión aparente, k_{dif}^a (A) y de la elasticidad dilatacional superficial inicial, E_{di} (B) de las películas de sistemas WPC/PS y WPI/PS (en el rango de concentración de PS de 0,0-1,0 %p/p) sobre la capacidad espumante global, OFC (ml/s). Símbolos: WPC/AS (■), WPI/AS (□), WPC/λ-C (●), WPI/λ-C (○). Concentración de proteína 1,0 %p/p, temperatura 20 °C, pH 7 y I 0,05 M.

(ii) Los valores de OFC de los sistemas WPC/ λ -C fueron independientes de k_{dif}^a y E_{di} . La capacidad espumante global en dichos sistemas estaría a nivel de un valor máximo (dado por los valores de OFC del WPI y de los sistemas WPI/PS) y en estas condiciones podría no depender de las propiedades interfaciales a cortos θ .

En resumen, estos resultados confirmarían que las propiedades dinámicas superficiales a cortos θ (k_{dif}^a y E_{di}) podrían tener alguna relación con la formación de espumas en los sistemas WPC/PS. Además, estos resultados sugerirían que las propiedades interfaciales y espumantes de los sistemas WPC/PS estarían determinadas por la naturaleza de las interacciones biopoliméricas tanto en la fase acuosa continua como en el entorno de la interfase aire-agua. De esta manera, la capacidad espumante de los sistemas WPC/AS podría ser relacionada con los fenómenos segregativos con agregación de la proteína en la subfase acuosa y en la interfase de los sistemas mixtos; mientras que la capacidad espumante observada en los sistemas WPC/ λ -C podría ser atribuida a la formación de complejos solubles entre estos biopolímeros, siendo estos más efectivos para la formación de espumas.

5.1.3.2. Efecto de los PS sobre la estabilidad de espumas de WPC

El efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-1,0 %p/p) sobre la estabilidad de espumas de WPC, caracterizada por los parámetros: tiempo de vida media ($t_{1/2}$, como una medida de la estabilidad estática de las espumas) y los tiempos de relajación correspondientes a las cinéticas de drenaje/regeneración marginal (t_d) y de

desproporción/colapso de las espumas (t_{dc}) se presenta en la Figura 5.25. En dicha Figura se incluye la evolución de $t_{1/2}$ del WPI con la concentración de PS en solución.

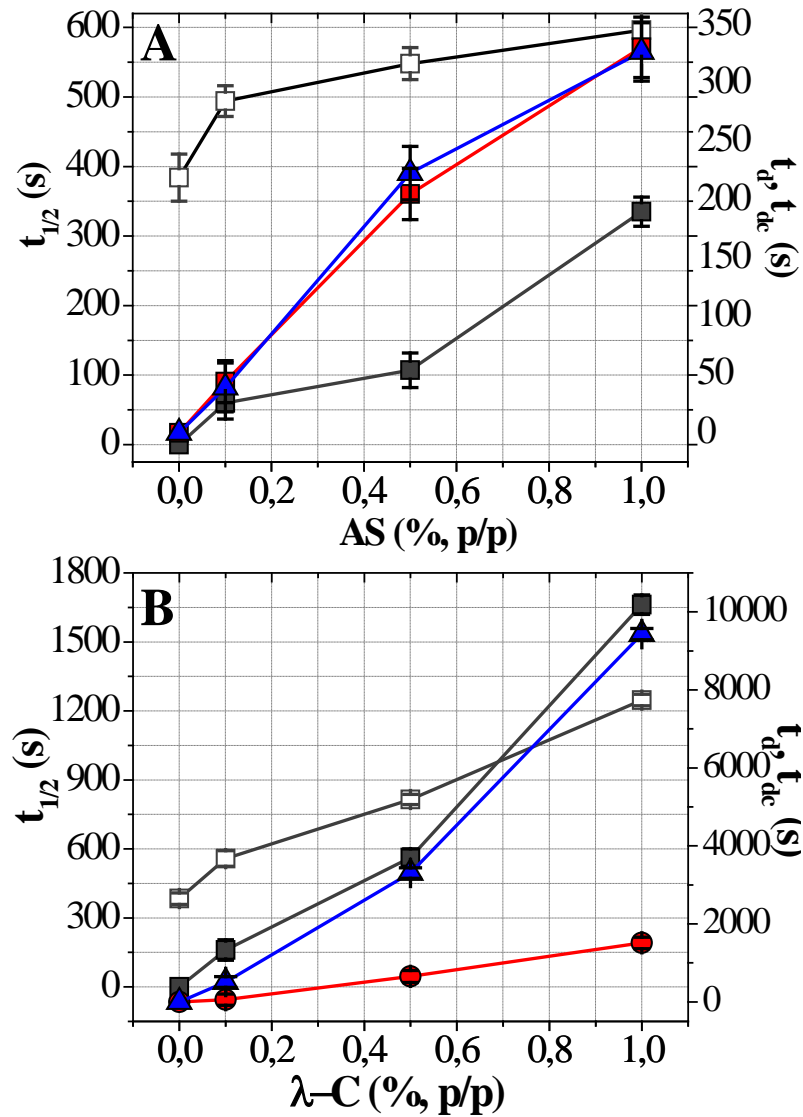


Figura 5.25. Efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-1,0 %p/p) sobre los parámetros de estabilidad de espumas de WPC: tiempo de vida media o estabilidad estática, $t_{1/2}$ (■) y tiempos de relajación correspondientes a los mecanismos de drenaje de líquido y regeneración marginal, t_d (●) y desproporción-colapso de burbujas, t_{dc} (▲). Se incluye la evolución de $t_{1/2}$ de las espumas de WPI como una función de la concentración de PS (□). Concentración de proteína 1,0 %p/p, temperatura 20 °C, pH 7 y I 0,05 M.

Tal como se ha descrito anteriormente, la estabilidad estática de las espumas, $t_{1/2}$, se determinó como el tiempo necesario para drenar la mitad del volumen de líquido incorporado en las espumas. Por otra parte, los tiempos de relajación, t_d y t_{dc} se obtuvieron adecuadamente mediante ajuste de los datos experimentales a la Ecuación 4.12 ($R \geq 0,986$). Se observó que:

(i) La magnitud de los parámetros de estabilidad evaluados ($t_{1/2}$, t_d y t_{dc}) aumentó gradualmente con el incremento de la concentración de PS en la fase acuosa. Este comportamiento pondría en evidencia la existencia de un efecto sinérgico de los PS sobre la estabilidad de las espumas de WPC.

(ii) La estabilidad estática de las espumas de los sistemas WPC/ λ -C fue mayor que la de los sistemas WPC/AS. El mismo comportamiento fue observado entre los sistemas WPI/ λ -C y WPI/AS. Si bien los PS no modificaron la capacidad espumante del WPI (tal como ha sido discutido en la sección previa), la estabilidad de sus espumas podría aumentar sustancialmente con el aumento progresivo de la concentración de PS en solución confirmando estudios previos. A partir de los resultados encontrados podría deducirse que la magnitud del efecto estabilizante de los PS sobre las espumas sería mayor en los sistemas mixtos conteniendo λ -C. En principio, este comportamiento podría relacionarse con la mayor viscosidad de sus dispersiones acuosas (365 ± 35 cp, al 1,0 %p/p) comparada con las de AS (45 ± 15 cp, al 1,0 %p/p). Además, cabe destacar que a la mayor concentración de λ -C, evaluada la estabilidad de las espumas conteniendo WPC fue mayor que las contuvieron WPI, lo que podría tener una gran significancia práctica.

(iii) En las espumas de los sistemas WPC/AS, la estabilidad estática ($t_{1/2}$) podría deberse tanto a una resistencia al mecanismo de drenaje de líquido/regeneración marginal (t_d) como a una resistencia a la desproporción/colapso de las burbujas (t_{dc}) (procesos de desestabilización individuales). Esto podría deducirse a partir de que los parámetros cinéticos t_d y t_{dc} fueron similares en magnitud y siguieron la misma tendencia que $t_{1/2}$, tras el incremento de la concentración de AS. Desde otro punto de vista, la inestabilidad de las espumas de los sistemas WPC/AS sería debido a la acción simultánea de los mecanismos de drenaje de líquido/regeneración marginal y desproporción/colapso.

(iv) En las espumas de los sistemas WPC/ λ -C, la estabilidad estática podría deberse mayormente a una resistencia a la desproporción/colapso de las burbujas de gas (proceso de desestabilización individual), debido a que $t_{1/2}$ y t_{dc} siguieron la misma tendencia tras el incremento de la concentración de λ -C. Desde otro punto de vista, la inestabilidad de las espumas de los sistemas WPC/ λ -C ocurriría primero debido al drenaje de líquido/regeneración marginal (dado el menor valor de t_d) y luego debido al mecanismo de desproporción/colapso (dado el mayor valor de t_{dc}). Por lo tanto, mientras que la viscosidad de la fase acuosa continua podría tener un efecto sobre la velocidad de drenaje gravitacional, la velocidad de desproporción/colapso de burbujas, y, consecuentemente, la estabilidad estática de las espumas de los sistemas WPC/ λ -C podrían ser más dependientes de las características interfaciales de las películas, fundamentalmente a largos θ .

Relación entre la estabilidad de espumas y las características interfaciales a largos θ

La estabilidad de espumas de proteínas podría relacionarse con las características dinámicas dilatacionales de las películas a largos θ (Carrera Sánchez y Rodríguez Patino, 2005). Para confirmar dicha hipótesis, la estabilidad estática ($t_{1/2}$) de las espumas de los sistemas WPC/PS fue relacionada con la elasticidad dilatacional de las películas adsorbidas sobre la interfase aire-agua a largos θ (E_{df} , a los 10.800 s). Esta relación se presenta en la Figura 5.26. En general, se observó que la estabilidad estática de las espumas de los sistemas WPC/PS aumentó con el incremento de la elasticidad dilatacional de las películas adsorbidas a largos θ . Por lo tanto, este resultado confirmaría que la elasticidad dilatacional a largos θ (E_{df}) de las películas interfaciales podría también explicar la estabilidad estática de las espumas de los sistemas WPC/PS.

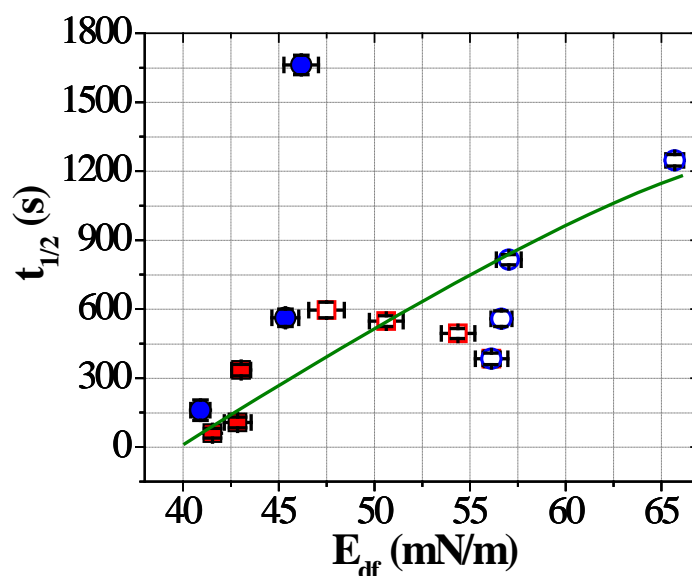


Figura 5.26. Efecto de la elasticidad dilatacional superficial final, E_{df} , de las películas de los sistemas WPC/PS y WPI/PS en el rango de concentración de PS de 0,0-1,0 % p/p, sobre el tiempo de vida media o estabilidad estática, $t_{1/2}$. Símbolos: WPC/AS (■), WPI/AS (□), WPC/ λ -C (●), WPI/ λ -C (○). Concentración de proteína 1,0 %p/p, temperatura 20 °C, pH 7 y I 0,05 M.

Por último, los resultados encontrados sugerirían que la estabilidad de las espumas de los sistemas WPC/PS podría depender fuertemente de la estructura química del PS, de su concentración relativa, y de la naturaleza de las interacciones entre los biopolímeros tanto en la fase acuosa como en el entorno de la interfase aire-agua. Así, la formación de complejos solubles WPC- λ -C podría controlar mejor la viscoelasticidad de las películas generando espumas muy estables; mientras que la existencia de fenómenos segregativos con agregación de la proteína en los sistemas WPC/AS podría reducir la viscoelasticidad de las películas y, consecuentemente, la estabilidad de las espumas de WPC.

5.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA HIDROLISIS ENZIMÁTICA LIMITADA SOBRE LAS PROPIEDADES INTERFACIALES Y ESPUMANTES DE PROTEÍNAS DE SUERO LACTEO

Como se ha mencionado en varias secciones de la presente Tesis Doctoral, la hidrólisis enzimática podría ser una estrategia conveniente para la modificación e incluso el mejoramiento de las propiedades interfaciales y espumantes de proteínas de suero lácteo. Sin embargo, los estudios utilizando el WPC de partida mostraron que un tratamiento limitado con α -quimiotripsina II no mejoró las características espumantes del WPC. Este comportamiento fue atribuido principalmente a su elevado contenido de grasa residual (8,0 %p/p) que pudo haber permanecido tras el tratamiento enzimático limitado. Por esta razón y para continuar con los objetivos propuestos en esta Tesis se utilizó WPI como sustrato de α -quimiotripsina II.

Por lo tanto, en la segunda parte de este Capítulo se presentan los resultados obtenidos en el estudio del efecto de la hidrólisis enzimática limitada sobre las propiedades interfaciales y espumantes de WPI, a pH neutro y fuerza iónica 0,05 M. Los resultados obtenidos serán discutidos en términos de algunos cambios estructurales del WPI tras el tratamiento enzimático (Sección 5.2.1) y del impacto de estos cambios sobre: (i) las características superficiales, cinéticas y reológicas de películas de WPI adsorbido sobre la interfase aire-agua (Sección 5.2.2) y (ii) las características de formación y estabilidad de espumas de WPI, en relación con las características interfaciales (cinéticas y reológicas) de dicha proteína (Sección 5.2.3).

5.2.1. Efecto de la hidrólisis enzimática limitada sobre la dinámica molecular del WPI en solución acuosa

5.2.1.1. Efecto del GH sobre la fluorescencia intrínseca del WPI

Como se mencionó en la Sección 5.1.1.1, el análisis de la fluorescencia del Trp constituye una buena herramienta para la caracterización de la dinámica molecular de proteínas en respuesta a distintos procesos y condiciones del medio acuoso.

La hidrólisis enzimática limitada podría inducir modificaciones en los parámetros de fluorescencia del Trp debido a los cambios conformacionales de la proteína tras el clivaje por proteasas. De esta manera, el análisis de dichas modificaciones podría brindar información sobre algunos cambios estructurales del WPI luego de una hidrólisis limitada usando la enzima α -quimiotripsina II.

El efecto de la hidrólisis enzimática limitada (en el rango de GH de 0,0-5,0 %) sobre las características de fluorescencia intrínseca (IF_{Trp}) del WPI se presenta en la Figura 5.27. Se observó que:

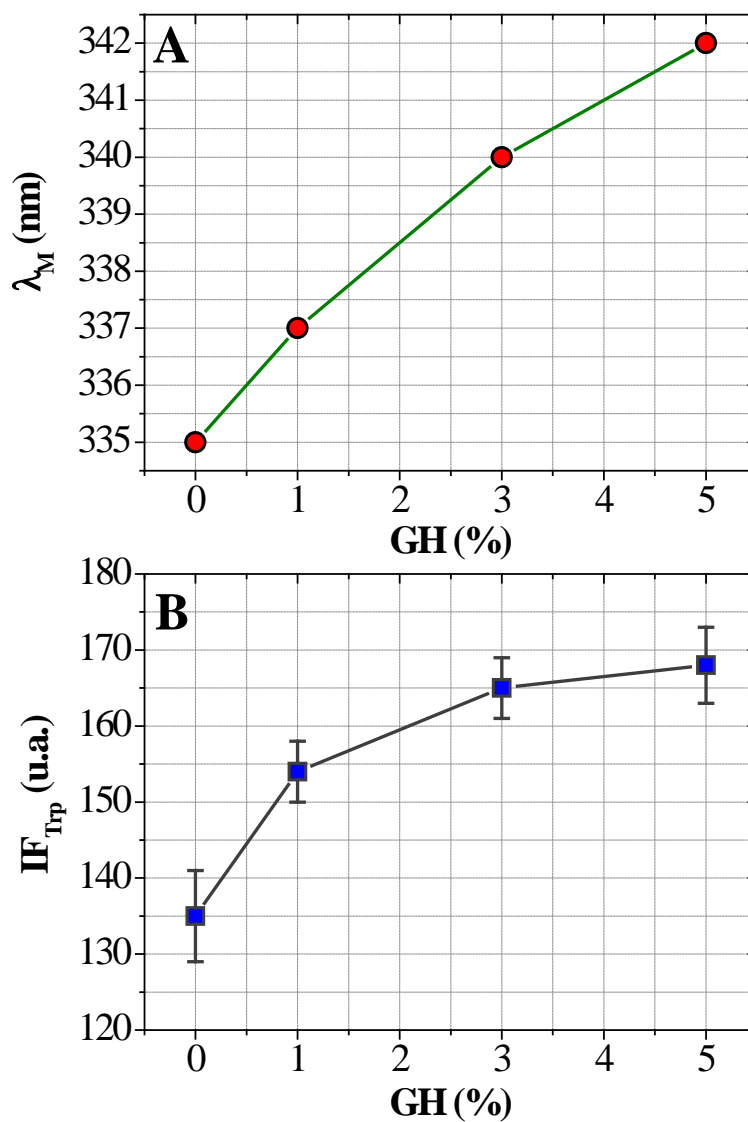


Figura 5.27. Efecto de la hidrólisis enzimática limitada (en el rango de GH de 0,0-5,0 %) sobre la longitud de onda de máxima intensidad de emisión, λ_M del WPI (A) y sobre la magnitud del pico de intensidad de emisión de fluorescencia, IF_{Trp} , (B). Concentración de proteína 1,0 %p/p, temperatura 20-23 °C, pH 7 y I 0,05 M.

(i) La dispersión de WPI (GH = 0,0 %) al 1,0 %p/p presentó un pico de máxima intensidad de emisión de Trp a nivel de 335 nm (λ_M) indicando que los residuos de Trp se localizarían inicialmente en un ambiente molecular hidrofóbico característico de proteínas nativas (Albani, 2004).

(ii) El aumento del GH provocó un desplazamiento gradual del valor de λ_M hacia mayores longitudes de onda (Figura 5.27A) y un incremento en la magnitud de la intensidad de emisión de fluorescencia alcanzando un máximo a mayores GH (Figura 5.27B).

El aumento gradual de IF_{Trp} del WPI podría interpretarse en términos de una mayor exposición y disponibilidad de sus residuos de Trp para la emisión de fluorescencia como una consecuencia de la hidrólisis enzimática limitada. De esta manera, con el aumento progresivo del GH del WPI, los residuos de Trp ocluidos en el interior hidrofóbico de las proteínas podrían exponerse gradualmente y localizarse en un microambiente más polar, lo que podría explicar el desplazamiento de λ_M hacia mayores longitudes de onda.

5.2.1.2. Efecto del GH sobre la fluorescencia extrínseca del WPI

El efecto de la hidrólisis enzimática limitada (en el rango de GH de 0,0-5,0 %) sobre la fluorescencia extrínseca del WPI fue evaluado en términos de la hidrofobicidad superficial de la proteína (S_0), tal como se presenta en la Figura 5.28. Se observó que el aumento del GH produjo un incremento en el valor de S_0 del WPI, encontrando un valor máximo a nivel de un GH de 3,0 %. En estas condiciones, el clivaje por parte de la

enzima podría conducir a la modificación estructural del WPI teniendo lugar una mayor exposición de sitios hidrofóbicos internos capaces de interactuar con el ANS. Este comportamiento se encontró consistente con el aumento de la intensidad de emisión del Trp discutido previamente. Sin embargo, al mayor GH evaluado, se observó una leve disminución del valor de S_0 .

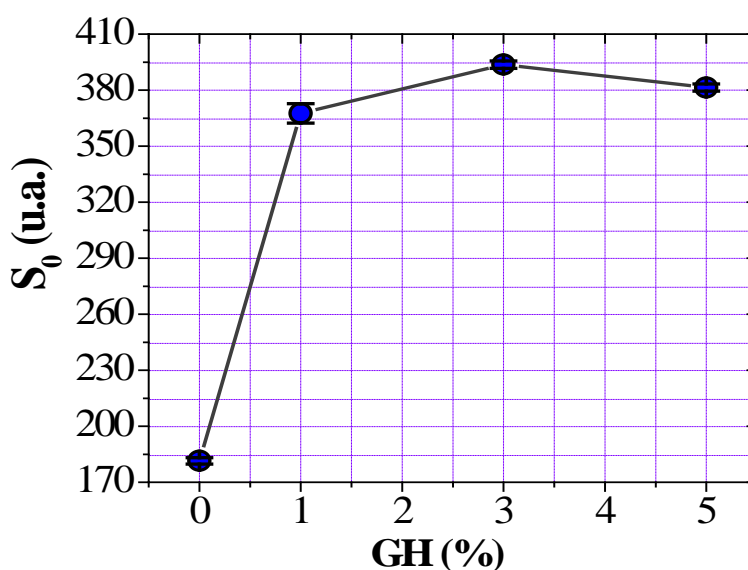


Figura 5.28. Efecto de la hidrólisis enzimática limitada (en el rango de GH de 0,0-5,0 %) sobre la hidrofobicidad superficial (S_0 , u.a.) del WPI. Concentración de proteína 1,0 %p/p, temperatura 20-23 °C, pH 7 y I 0,05 M.

Dado que la enzima α -quimiotripsina es una proteasa de serina específica para aminoácidos hidrofóbicos (Tyr, Trp, Phe, Met, Leu) sería probable que bajo la acción catalítica disminuya el número de sitios hidrofóbicos superficiales de unión del ANS y/o se modifique su accesibilidad a los sitios de unión debido a la existencia de interacciones de tipo proteína-proteína o proteína-polipéptido, produciendo una leve disminución en el valor de S_0 .

5.2.2. Efecto de la hidrólisis enzimática limitada sobre la dinámica interfacial del WPI

5.2.2.1. Efecto del GH sobre las propiedades superficiales del WPI en el equilibrio

El efecto de la concentración de proteína ($1 \cdot 10^{-6}$ -2,0 %p/p) en la subfase acuosa sobre la magnitud de la presión superficial de equilibrio- π_{eq} (isoterma de adsorción) de las películas de WPI y de sus hidrolizados adsorbidos sobre la interfase aire-agua se presenta en la Figura 5.29A. Como se comentó en la Sección 5.1.2.1, la isoterma de adsorción del WPI presentó una forma sigmoidea, característica de proteínas globulares (Rodríguez Niño y col., 2001). Se observó que el tratamiento enzimático limitado provocó un leve cambio en la forma de la isoterma de adsorción del WPI dependiendo del GH. Este comportamiento podría asociarse con una transición y/o modificación de la estructuración interfacial del WPI adsorbido como consecuencia de la hidrólisis enzimática limitada (Martínez y col., 2009a).

El incremento de la concentración de proteína en solución provocó un aumento en la magnitud de π_{eq} de todas las películas alcanzando un *plateau* a nivel de la concentración de 1,0 %p/p (eficiencia de adsorción). Este resultado sugeriría que la concentración de saturación de la interfase por parte de WPI (tal como se discutió en la Sección 5.1.2.1) no se alteraría tras la hidrólisis enzimática limitada. Sin embargo, a nivel de la concentración de saturación, π_{eq} aumentó con el incremento del GH del WPI. Este comportamiento es representado en la Figura 5.29B, donde la actividad superficial es definida como el valor de π_{eq} a nivel de la eficiencia de adsorción. Así, el

incremento del GH podría provocar un aumento de la actividad superficial del WPI debido a una mayor exposición de los *patches* hidrofóbicos en la proteína (Miñones Conde y Rodríguez Patino, 2007), tal como ha sido discutido previamente.

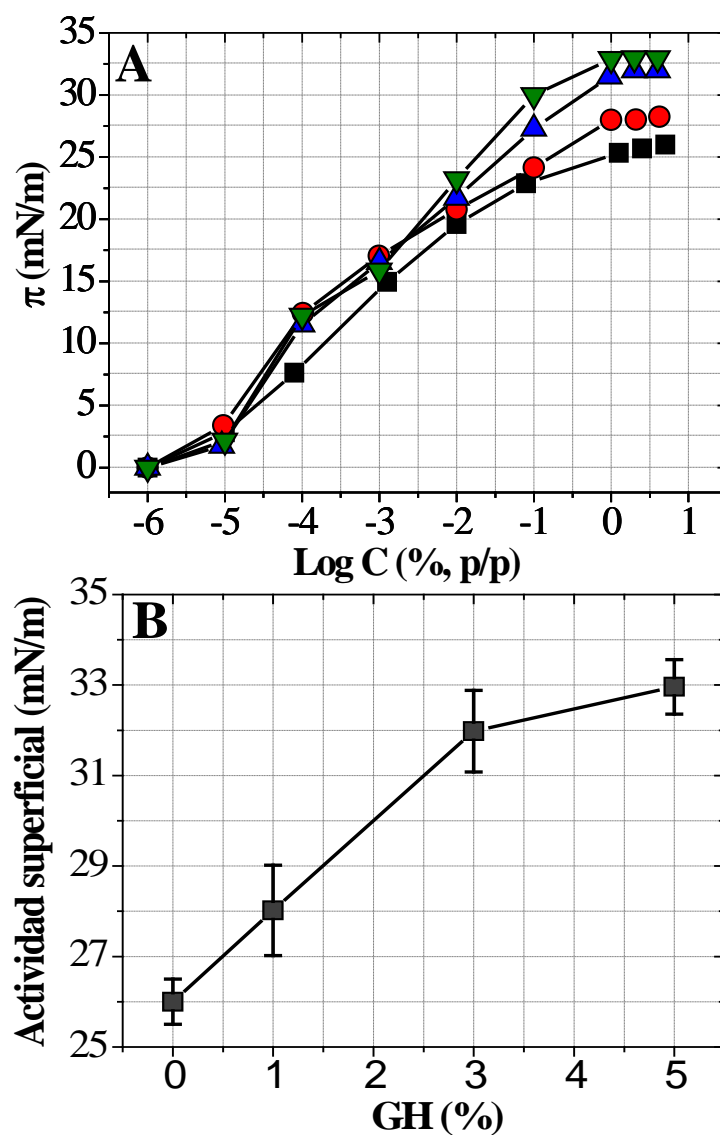


Figura 5.29. Efecto de la hidrólisis enzimática limitada (en el rango de GH de 0,0-5,0 %) sobre la isoterma de adsorción (A) y sobre la actividad superficial del WPI (B). Símbolos GH: 0,0 % (■), 1,0 % (●), 3,0 % (▲) y 5,0 % (▼). Temperatura 20 °C, pH 7 y I 0,05 M.

En la bibliografía, una mayor actividad superficial de hidrolizados proteicos de proteínas de suero lácteo ha sido relacionada con un mejoramiento de su capacidad espumante (Caessens y col., 1999). No obstante, diferentes mecanismos podrían estar involucrados en la formación y estabilidad de una espuma, donde las propiedades de equilibrio de las películas jugarían un rol complejo (Damodaran, 1990).

En la creación de una espuma, las propiedades dinámicas (cinética de adsorción interfacial y características reológicas superficiales) de las películas podrían tener una mayor significancia que las propiedades de equilibrio.

5.2.2.2. Efecto del GH sobre la dinámica de formación de películas de WPI

La Figura 5.30 presenta el efecto del GH sobre la evolución temporal de la presión superficial (π , mN/m) de las películas de WPI adsorbido en condiciones de saturación de la interfase aire-agua (1,0 %p/p). En general, se observó un aumento gradual de los valores de π con el incremento del tiempo de adsorción (θ) y del GH. La dependencia temporal de este comportamiento podría relacionarse con la naturaleza dinámica del fenómeno de adsorción interfacial del WPI y de sus hidrolizados (Graham y Phillips, 1979; Damodaran y Song, 1988; MacRitchie, 1990). Además, se observó que a largos θ , los valores de π fueron consistentes con los valores de π_{eq} a nivel de la eficiencia de adsorción (como puede deducirse a partir de la Figura 5.29B).

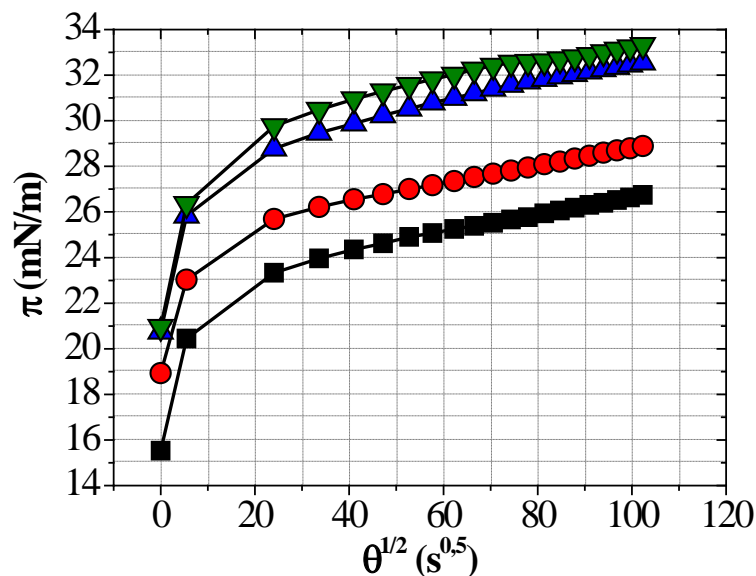


Figura 5.30. Efecto de la hidrólisis enzimática limitada (en el rango de GH de 0,0-5,0 %) sobre la evolución temporal de la presión superficial (π , mN/m) de la película adsorbida de WPI sobre la interfase aire-agua. Símbolos GH: 0,0 % (■), 1,0 % (●), 3,0 % (▲) y 5,0 % (▼). Concentración de proteína 1,0 %p/p, temperatura 20 °C, pH 7 y I 0,05 M.

5.2.2.3. Efecto del GH sobre la cinética de adsorción interfacial del WPI

El efecto de la hidrólisis enzimática limitada (en el rango de GH de 0,0-5,0 %) sobre la cinética del proceso de adsorción interfacial del WPI (etapas de difusión molecular, penetración y reordenamiento configuracional de los segmentos adsorbidos sobre la interfase) pudo determinarse a partir de la evolución temporal de la presión superficial de las películas, tal como se ha descrito previamente (Secciones 4.2.3.1 y 4.2.3.2). La Figura 5.31 presenta la aplicación del modelo cinético propuesto para describir la influencia de la hidrólisis enzimática limitada (en el rango de GH de 0,0-5,0

%) sobre la etapas de difusión (Figura 5.30A) y penetración y reordenamiento configuracional de segmentos adsorbidos sobre la interfase aire-agua (Figura 5.31B).

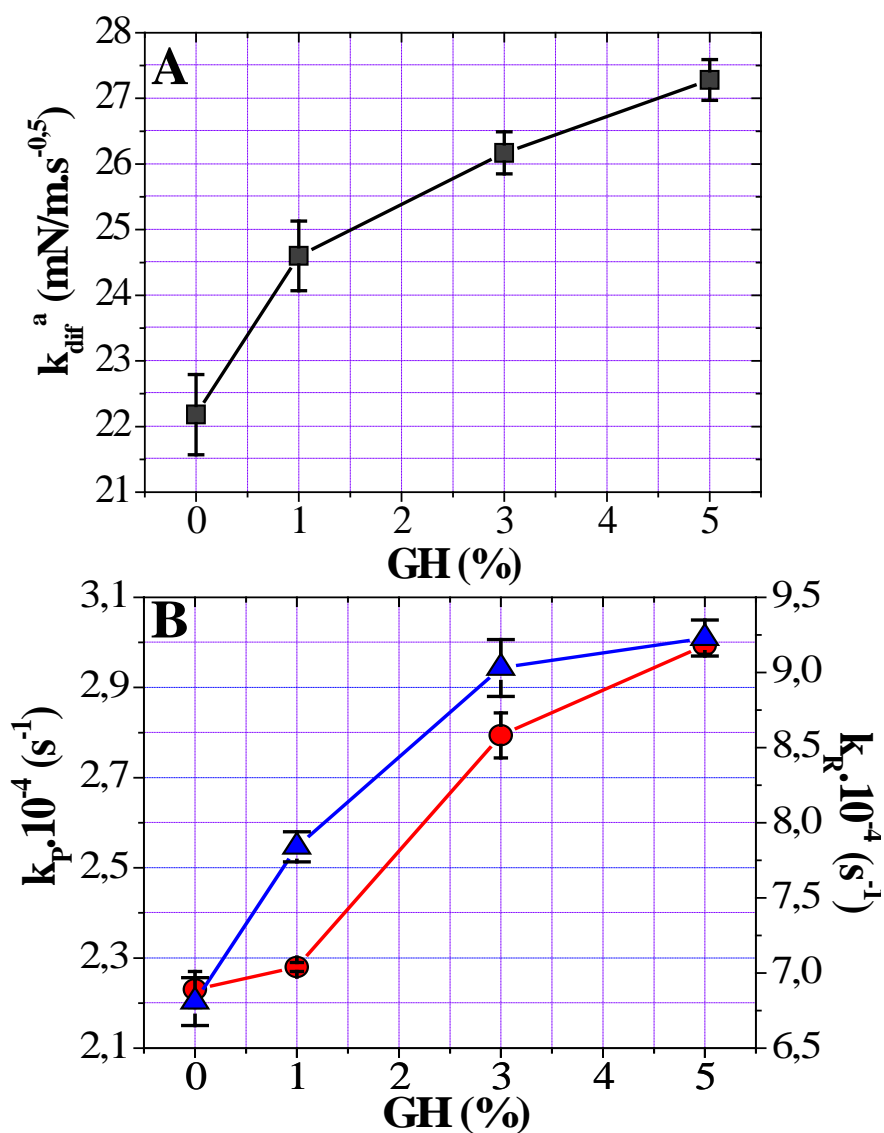


Figura 5.31. Efecto de la hidrólisis enzimática limitada (en el rango de GH de 0,0-5,0 %) sobre la constante de velocidad de difusión aparente, k_{dif}^a (A) y sobre las constantes de velocidad de penetración (k_p) y reordenamiento configuracional (k_R) de WPI adsorbido sobre la interfase aire-agua (B). Símbolos: k_{dif}^a (■), k_p (●) y k_R (▲). Concentración de proteína 1,0 %p/p, temperatura 20 °C, pH 7 y I 0,05 M.

A la concentración de proteína evaluada (1,0 %p/p), se observó que la etapa de difusión transcurrió muy rápidamente (con $\pi > 10$ mN/m) como para ser evaluada por el método experimental empleado. El mismo comportamiento fue observado en la cuantificación de la velocidad de difusión de la β -LG (Álvarez Gómez y Rodríguez Patino, 2006) y el WPC a la misma concentración en solución (tal como fue comentado y discutido en la Sección 5.1.2.3). Este resultado podría suponer que a cortos θ , el proceso de adsorción del WPI y de sus hidrolizados, no estaría controlado por el transporte difusivo hacia la interfase aire-agua. Sin embargo, al inicio del proceso de adsorción (0,5 s), la pendiente de la gráfica de $\pi-\theta^{1/2}$ podría considerarse como una constante de velocidad de difusión aparente, $k_{\text{dif}}^{\text{a}}$ (Perez y col., 2009), de las proteínas bajo estudio (tal como se ha mencionado en la Sección 5.1.2.3).

El efecto de la hidrólisis enzimática limitada (en el rango de GH de 0,0-5,0 %) sobre la magnitud de $k_{\text{dif}}^{\text{a}}$ del WPI se muestra en el Figura 5.31A. Se observó un aumento del valor de $k_{\text{dif}}^{\text{a}}$ con el incremento del GH. Este comportamiento podría relacionarse con: (i) la reducción del tamaño molecular del WPI (como puede deducirse a partir de la Figura 4.4), (ii) la mayor exposición de los *patches* hidrofóbicos en la proteína (como puede deducirse a partir de las Figuras 5.27 y 5.28), (iii) el aumento de la actividad superficial del WPI como consecuencia del tratamiento enzimático aplicado (como puede deducirse a partir de la Figura 5.29B) y/o (iv) la acción combinada de los mismos.

La Figura 5.31B muestra la aplicación de la Ecuación 4.6 para describir el proceso de adsorción interfacial del WPI y de sus hidrolizados, a largos θ . Se observó que los datos experimentales se ajustaron adecuadamente al modelo cinético propuesto,

obteniéndose en todos los casos valores de $R \geq 0,980$. Se observó un aumento de las constantes k_P y k_R del WPI con el incremento del GH. El aumento en la velocidad de penetración del WPI podría relacionarse con una rápida difusión y/o con un incremento de la afinidad hacia la interfase debido a la mayor exposición de los *patches* hidrofóbicos en la proteína (como puede deducirse a partir de las Figuras 5.27 y 5.28). Por otra parte, el aumento de la velocidad de reordenamiento del WPI podría asociarse con un incremento en la flexibilidad molecular de la proteína como consecuencia de la hidrólisis limitada, lo que también podría favorecer el desplegamiento y el aumento en el número de interacciones entre segmentos adsorbidos (Chobert y col., 1988; Vioque y col., 2000; Miñones Conde y Rodríguez Patino, 2007).

Finalmente, se observó que los valores de k_P fueron menores a los de k_R , lo que sugeriría que el paso de penetración sería la etapa limitante del proceso de adsorción interfacial tanto para el WPI como para sus hidrolizados.

5.2.2.4. Efecto del GH sobre las propiedades dilatacionales superficiales de películas de WPI

El efecto de la hidrólisis enzimática limitada (en el rango de GH de 0,0-5,0 %p) sobre la evolución temporal de los parámetros reológicos dilatacionales superficiales (E , E_d , E_v y ϕ) de las películas de hidrolizados de WPI adsorbidos sobre la interfase aire-agua se presenta en la Figura A2.3 del Apéndice II. A partir de las mismas se pudo observar que: (i) los valores de E y E_d fueron altos y similares y (ii) los valores de E_v y ϕ fueron bajos, fundamentalmente a largos θ . Por lo tanto, como consecuencia de este

comportamiento reológico podría concluirse que las características dilatacionales superficiales del WPI y sus hidrolizados fueron esencialmente elásticas a nivel de la frecuencia angular (ω) aplicada (100 mHz) y, especialmente, a largos θ . Sin embargo, se observó que la magnitud de dichos parámetros reológicos dependió fuertemente del GH del WPI, como se discutirá a continuación.

El efecto de la hidrólisis enzimática limitada (en el rango de GH de 0,0-5,0 %) sobre la evolución temporal de la componente elástica o elasticidad dilatacional superficial (E_d , mN/m) y sobre el ángulo de fase (ϕ) de las películas de WPI adsorbido sobre la interfase aire-agua, se presenta en la Figura 5.32. Con respecto al WPI sin hidrolizar, se observó que GH comprendidos entre 1,0-3,0 % (H1 y H2) provocaron un incremento de los valores de E_d y una disminución gradual de los valores de ϕ . Sin embargo, un aumento posterior del GH a 5,0 % (H3) prácticamente no provocó cambios en los valores de E_d y ϕ , respecto de H2 (GH = 3,0 %), fundamentalmente a largos θ . Este comportamiento sugeriría que en el rango de GH = 3,0-5,0 %, las características viscoelásticas de las películas de hidrolizados estarían a nivel de un máximo. El comportamiento observado podría explicarse considerando un aumento en la resistencia mecánica (debido al aumento del carácter elástico) de las películas frente a la deformación dilatacional como consecuencia de un mayor número de interacciones entre segmentos de proteína adsorbidos (Rodríguez Patino y col., 2003). Este aumento en el número de interacciones entre segmentos adsorbidos sobre la interfase podría vincularse con la mayor exposición de *patches* hidrofóbicos y con el aumento de la flexibilidad de los hidrolizados como consecuencia del tratamiento enzimático aplicado.

Esta observación sería consistente con los elevados valores de k_R obtenidos para los hidrolizados de WPI comentados y discutidos en la sección anterior.

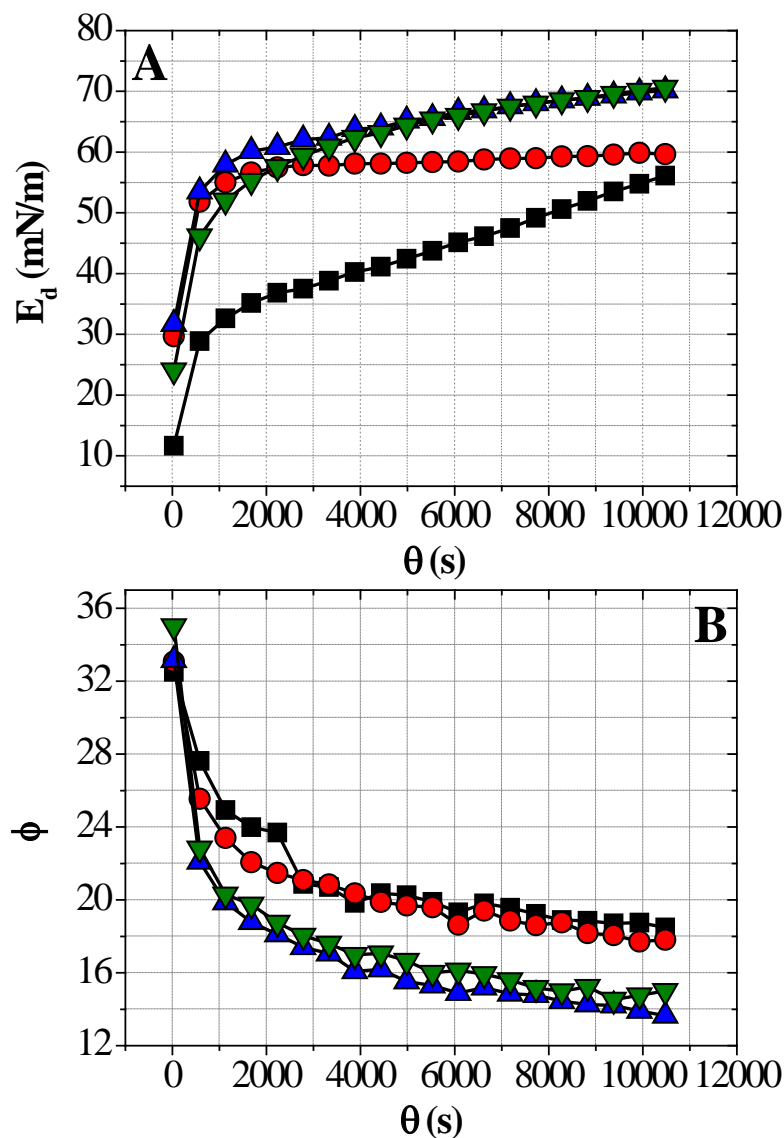


Figura 5.32. Efecto de la hidrólisis enzimática limitada (en el rango de GH de 0,0-5,0 %) sobre la evolución temporal de la elasticidad dilatacional superficial, E_d (A) y sobre el ángulo de fase ϕ (B) de la película adsorbida de WPI sobre la interfase aire-agua. Símbolos GH: 0,0 % (\blacksquare), 1,0 % (\bullet), 3,0 % (\blacktriangle) y 5,0 % (\blacktriangledown). Amplitud de deformación ($\Delta A/A$) 10 %, Frecuencia angular (ω) 100 mHz, Concentración de proteína 1,0% p/p, Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05M.

5.2.2.5. Efecto del GH sobre la estructuración interfacial del WPI

Como se ha mencionado en la sección 5.1.2.5, el módulo dilatacional, E , aumenta con el incremento de la presión superficial, π , sugiriendo la existencia de un elevado número de interacciones macromoleculares entre segmentos de proteína adsorbidos sobre la interfase aire-agua (Rodríguez Patino y col., 2003).

El efecto de la hidrólisis enzimática limitada (en el rango de GH de 0,0-5,0 %) sobre la estructuración interfacial, representada por la curva $E-\pi$ (curva máster) para la película WPI se presenta en la Figura 5.33.

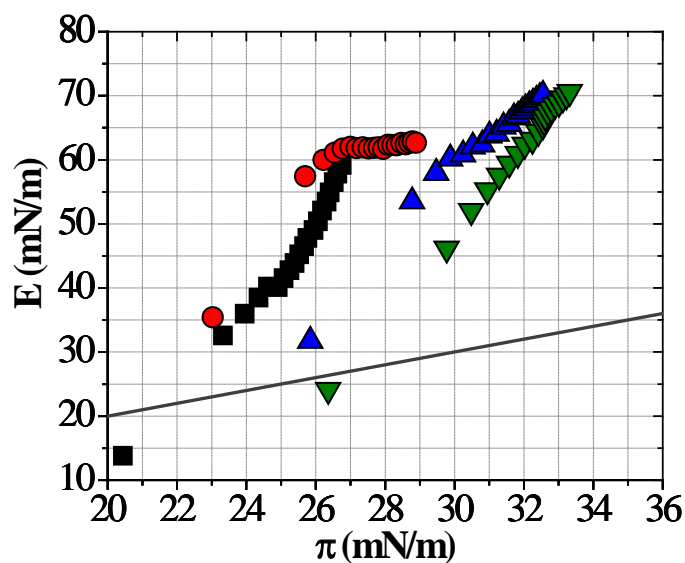


Figura 5.33. Efecto de la hidrólisis enzimática limitada (en el rango de GH de 0,0-5,0 %) sobre la estructuración interfacial (representada por la curva máster $E-\pi$) de la película adsorbida de WPI sobre la interfase aire-agua. Símbolos GH: 0,0 % (■), 1,0 % (●), 3,0 % (▲) y 5,0 % (▼). Amplitud de deformación ($\Delta A/A$) 10 %, Frecuencia angular (ω) 100 mHz, Concentración de proteína 1,0% p/p, Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05M.

Del análisis de la misma podría deducirse que:

(i) Las pendientes de las curvas fueron mayores que la unidad (línea de trazo continuo en la Figura 5.33) lo que confirmaría el comportamiento no-ideal de las películas sugiriendo la existencia de un gran número de interacciones entre los segmentos adsorbidos (Lucassen Reynders y col., 1975).

(ii) Las curvas E- π no se normalizaron en una sola curva, indicando que la hidrólisis enzimática limitada podría provocar distintos efectos sobre la estructuración molecular del WPI adsorbido dependiendo de la magnitud del GH (Miñones Conde y Rodríguez Patino, 2005).

(iii) El aumento del GH provocó un desplazamiento gradual de las curvas hacia mayores valores de π indicando un mayor empaquetamiento y condensación de los segmentos de hidrolizados adsorbidos sobre la interfase aire-agua.

5.2.3. Efecto de la hidrólisis enzimática limitada sobre las propiedades espumantes de WPI

5.2.3.1. Efecto del GH sobre la formación de espumas de WPI

El efecto de la hidrólisis enzimática limitada (en el rango de GH de 0,0-5,0 %) sobre la formación de espumas de WPI, caracterizada por los parámetros: capacidad espumante global (OFC, ml/s) y conductividad relativa (C_f , %), se presenta en la Figura 5.34. Se observó que un GH de 1,0 % fue suficiente para producir un aumento en el valor de OFC del WPI, el que se mantuvo constante tras el incremento del GH. Además,

se observó que los valores C_f del WPI evolucionaron de la misma manera tras el incremento del GH indicando la formación de burbujas más pequeñas y más densas.

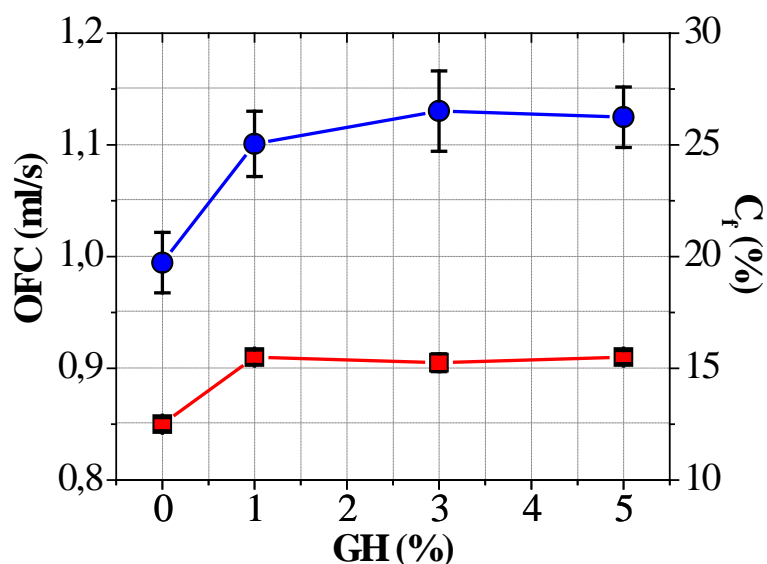


Figura 5.34. Efecto de la hidrólisis enzimática limitada (en el rango de GH de 0,0-5,0 %) sobre los parámetros de formación de espumas de WPI: capacidad espumante global, OFC (■) y conductividad relativa, C_f (●). Concentración de proteína 1,0 %p/p, temperatura 20 °C, pH 7 y I 0,05 M.

En general, el comportamiento observado sugeriría que la hidrólisis enzimática limitada tuvo un efecto positivo sobre la formación de espumas de WPI. Este resultado se halló consistente con estudios previos demostrando que una hidrólisis limitada sería suficiente para potenciar la espumabilidad de proteínas de suero lácteo (Ipsen y col., 2001). Así, la modificación de la estructura molecular como una consecuencia del tratamiento enzimático, fundamentalmente, a nivel de la reducción del tamaño molecular y mayor exposición de *patches* hidrofóbicos y actividad superficial, podría promover un aumento de la capacidad espumante del WPI.

Relación entre la formación de espumas y las características interfaciales a cortos θ

Como se ha mencionado anteriormente, la capacidad espumante de una proteína podría relacionarse con su velocidad de difusión hacia la interfase (Carrera Sánchez y Rodríguez Patino, 2005) y con las características viscoelásticas de sus películas interfaciales (Murray, 2002; Rodríguez Patino y col., 2003).

Para comprobar esta hipótesis, los parámetros de formación (OFC y C_f) de espumas fueron relacionados con la constante de velocidad de difusión aparente de la proteína (k_{dif}^a) y con la elasticidad dilatacional inicial (E_{di} , a los 0,5 s de adsorción interfacial) de las películas de hidrolizados de WPI (en el rango de GH = 0,0-5,0 %) adsorbidos sobre la interfase aire-agua. Estas relaciones se presentan en la Figura 5.35. Se observó que los parámetros de formación de espumas (OFC y C_f) aumentaron con el incremento de k_{dif}^a (Figura 5.35A). Así, un aumento de la velocidad de difusión de la proteína (como consecuencia de la hidrólisis enzimática limitada) podría explicar, en parte, el aumento de la capacidad espumante del WPI. Además, se encontró una relación entre los parámetros de formación (OFC y C_f) y la magnitud del valor de E_{di} de las películas de hidrolizados, tal como se muestra en la Figura 5.35B. De esta manera, la elasticidad inicial de las películas podría también ejercer un rol importante en la formación de espumas de hidrolizados de WPI.

Por lo tanto, los resultados encontrados confirmarían que la dinámica de adsorción y las propiedades mecánicas de las películas a cortos θ serían relevantes para la formación de espumas de hidrolizados de WPI.

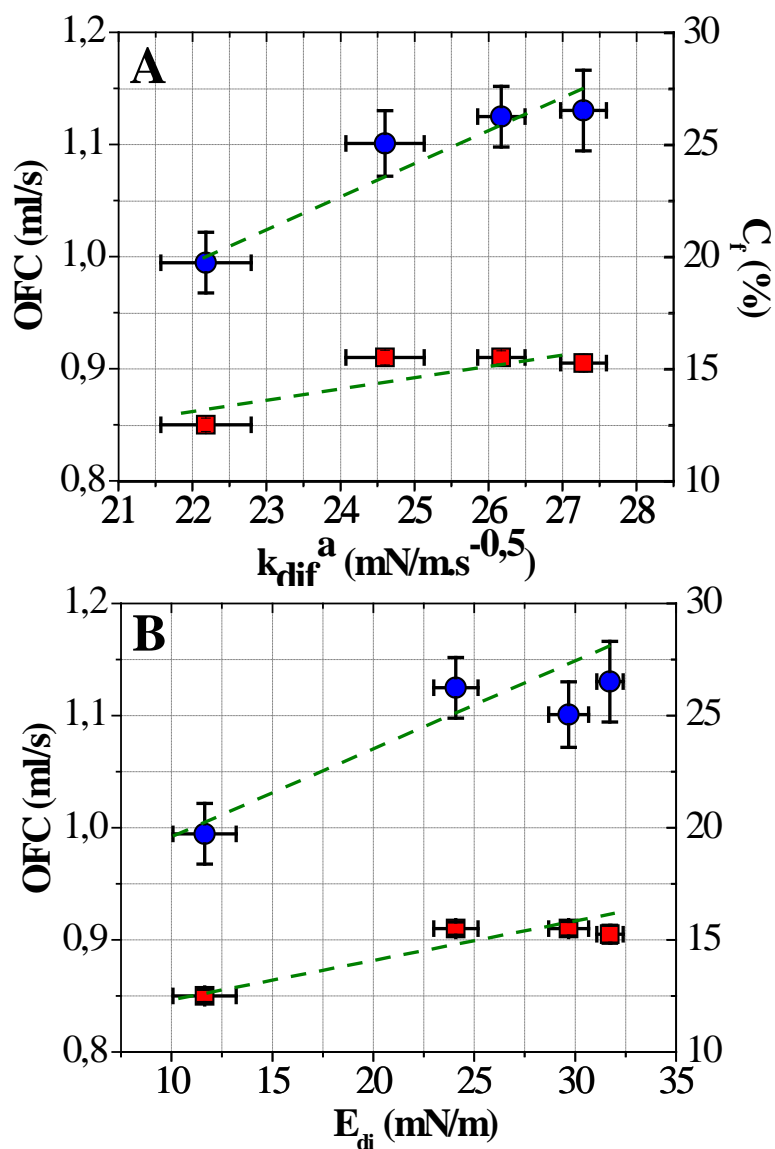


Figura 5.35. Efecto de la velocidad difusión aparente, k_{dif}^a (A) y de la elasticidad dilatacional superficial inicial, E_{di} (B) de las películas de hidrolizados de WPI (en el rango de GH de 0,0-5,0 %) sobre los parámetros de formación de espumas de WPI: capacidad espumante global, OFC (■) y conductividad relativa, C_f (●). Concentración de proteína 1,0 %p/p, temperatura 20 °C, pH 7 y I 0,05 M.

5.2.3.2. Efecto del GH sobre la estabilidad de espumas de WPI

El efecto de la hidrólisis enzimática limitada (en el rango de GH de 0,0-5,0 %) sobre la estabilidad de espumas de WPI, caracterizada por los parámetros: tiempo de vida media ($t_{1/2}$, como una medida de la estabilidad estática de las espumas) y los tiempos de relajación correspondientes a las cinéticas de drenaje gravitacional de líquido/regeneración marginal (t_d) y de desproporción/colapso de las espumas (t_{dc}) se presenta en la Figura 5.36.

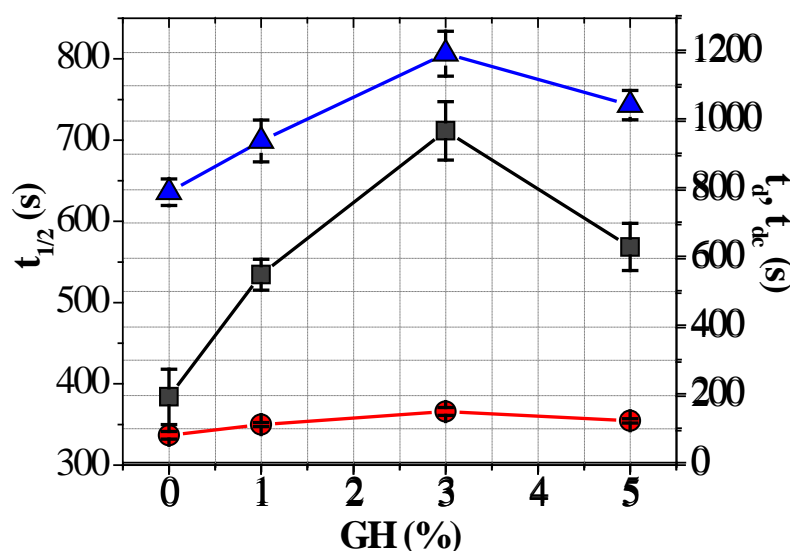


Figura 5.36. Efecto de la hidrólisis enzimática limitada (en el rango de GH de 0,0-5,0 %) sobre los parámetros de estabilidad de espumas de WPI: tiempo de vida media o estabilidad estática, $t_{1/2}$ (■) y tiempos de relajación correspondientes a los mecanismos de drenaje gravitacional de líquido/regeneración marginal, t_d (●) y desproporción/colapso, t_{dc} (▲). Concentración de proteína 1,0 %p/p, temperatura 20 °C, pH 7 y I 0,05 M.

Como se ha descrito anteriormente, la estabilidad estática de las espumas de WPI y de sus hidrolizados, $t_{1/2}$, se determinó como el tiempo necesario para drenar la mitad del volumen de líquido incorporado en las espumas. Por otra parte, los tiempos de

relajación, t_d y t_{dc} se obtuvieron adecuadamente mediante ajuste de los datos experimentales a la Ecuación 4.12 ($R \geq 0,970$). Se observó que los valores de $t_{1/2}$ y t_{dc} aumentaron con el incremento del GH, encontrando un valor máximo a nivel de un GH de 3,0 % (H2), mientras que la magnitud del parámetro t_d fue prácticamente independiente del GH (sobre la misma escala de tiempo de t_d). Los resultados encontrados sugerirían que la estabilidad estática de las espumas podría ser mayormente debida a una resistencia a la desproporción/colapso de burbujas (proceso de desestabilización individual), debido a que $t_{1/2}$ y t_{dc} siguieron la misma tendencia tras el incremento del GH del WPI. La estabilidad de las espumas frente al mecanismo de desproporción/colapso podría vincularse con las características mecánicas y viscoelásticas de las películas de hidrolizados de WPI adsorbidos sobre la interfase aire-agua (Rodríguez Patino y col., 2007a; 2007b).

Relación entre la estabilidad de espumas y las características interfaciales a largos θ

Para comprobar la existencia de una relación entre la estabilidad de las espumas de hidrolizados de WPI y las características interfaciales a largos θ , los parámetros de estabilidad ($t_{1/2}$, t_d y t_{dc}) de espumas fueron evaluados respecto a la elasticidad dilatacional final (E_{df} , a los 10.800 s de adsorción interfacial) de las películas interfaciales. Estas relaciones se presentan en la Figura 5.37. Se observó que los valores de $t_{1/2}$ y t_{dc} aumentaron con el incremento de E_{df} , mientras que t_d fue independiente de la elasticidad dilatacional final de las películas (sobre la misma escala de tiempo de t_d).

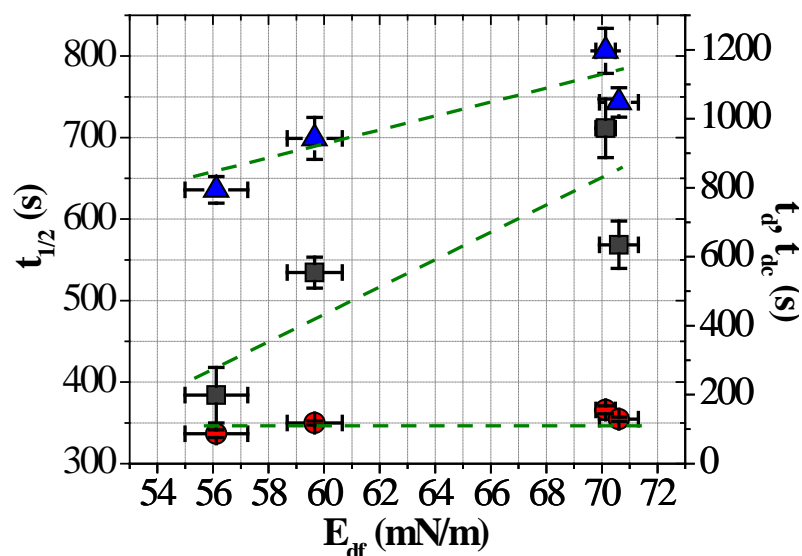


Figura 5.37. Efecto de la elasticidad dilatacional superficial final, E_{df} , de las películas de hidrolizados de WPI (en el rango de GH de 0,0-5,0 %) sobre los parámetros de estabilidad de espumas de WPI: tiempo de vida media o estabilidad estática, $t_{1/2}$ (■) y tiempos de relajación correspondientes a los mecanismos de drenaje de líquido/regeneración marginal, t_d (●) y desproporción/colapso, t_{dc} (▲). Concentración de proteína 1,0 %p/p, temperatura 20 °C, pH 7 y I 0,05 M.

Por lo tanto, podría deducirse que un aumento de la elasticidad dilatacional superficial (a largos θ) de las películas podría explicar la resistencia frente al mecanismo de desproporción/colapso de burbujas y, consecuentemente, la estabilidad estática de las espumas de hidrolizados de WPI. Por lo tanto, los resultados encontrados confirmarían que las propiedades mecánicas de las películas a largos θ serían relevantes para la estabilidad de espumas de hidrolizados de WPI.

5.3. ESTUDIO DE LA ADICION DE POLISACARIDOS SOBRE LAS PROPIEDADES INTERFACIALES Y ESPUMANTES DE HIDROLIZADOS DE PROTEINAS DE SUERO LACTEO

En la tercera y última parte de este Capítulo se presentan los resultados obtenidos en el estudio del efecto de la adición de dos tipos de polisacáridos aniónicos no superficialmente activos (PS), tales como alginato de sodio (AS) y λ -carragenina (λ -C), sobre las propiedades interfaciales y espumantes de hidrolizados de WPI, a pH neutro y fuerza iónica 0,05 M. Específicamente, se discutirán los efectos del tipo de PS y de su concentración relativa en solución sobre: (i) la dinámica molecular de hidrolizados de WPI en solución acuosa (Sección 5.3.1), (ii) las características superficiales, cinéticas y reológicas de películas de hidrolizados de WPI adsorbidos sobre la interfase aire-agua (Sección 5.1.2) y (iii) las características de formación y estabilidad de espumas de hidrolizados de WPI, en relación con las características interfaciales (cinéticas y reológicas) de los mismos (Sección 5.1.3).

5.3.1. Efecto de la adición de polisacáridos sobre la dinámica molecular de hidrolizados de WPI en solución acuosa

5.3.1.1. Efecto de los PS sobre la fluorescencia intrínseca de hidrolizados de WPI

La Figura 5.38 presenta el efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la máxima intensidad de emisión de fluorescencia del Trp (IF_{Trp} , u.a.) como una función del GH (0,0-5,0 %) del WPI.

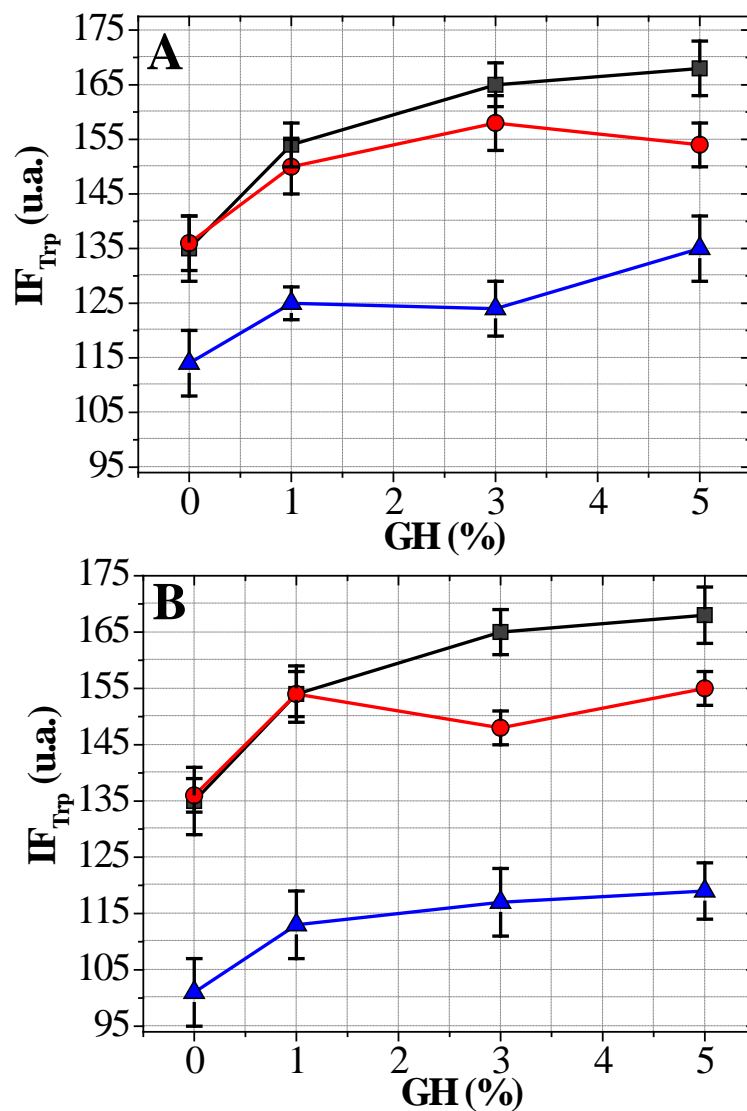


Figura 5.38. Efecto de la concentración de AS (A) y λ -C (B), en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p, sobre la intensidad de fluorescencia intrínseca del Trp (IF_{Trp} , u.a.) como una función del GH del WPI. Sistemas Prot:PS: (■) 1,0:0,0 %p/p, (●) 1,0:0,1 %p/p, (▲) 1,0:0,5 %p/p. Temperatura 20 °C, pH 7, and I 0,05M.

La adición de PS produjo distintos efectos sobre la magnitud de IF_{Trp} dependiendo de la concentración de PS en solución y del GH del WPI. Se observó que:

(i) En ausencia de PS, la magnitud de IF_{Trp} del WPI aumentó con el incremento del GH sugiriendo una mayor exposición y disponibilidad de los residuos de Trp para la emisión de fluorescencia. Como se ha comentado y discutido en la sección 5.2.1.1, este comportamiento sería atribuido a la modificación estructural del WPI como consecuencia del tratamiento enzimático aplicado.

(ii) La adición de PS al 0,1 %p/p no provocó cambios en la magnitud de IF_{Trp} de los hidrolizados en el rango de GH = 0,0-1,0 %. Sin embargo, los PS produjeron una disminución del valor de IF_{Trp} , especialmente a nivel del mayor GH evaluado (GH = 5,0 %).

(iii) La adición de PS al 0,5 %p/p provocó una disminución de los valores de IF_{Trp} de una manera prácticamente independiente del GH y del tipo de PS.

(iv) En el rango de GH evaluado (0,0-5,0 %) la adición de PS no modificó el valor de λ_M sugiriendo la conservación de la polaridad del entorno molecular de los residuos de Trp en los hidrolizados.

A partir de los resultados encontrados podría deducirse que existió una disminución de la emisión de fluorescencia del Trp favorecida tanto por el aumento de la concentración de PS como por el incremento del GH del WPI. En estas condiciones, el comportamiento observado sugeriría la existencia de interacciones biopoliméricas intermoleculares en la subfase acuosa de los sistemas mixtos sin modificar el ambiente molecular (polaridad) de los residuos de Trp de los hidrolizados. En estos sistemas, la reducción de la intensidad de fluorescencia (a nivel de λ_M) podría vincularse con la existencia de un fenómeno de *quenching* colisional (Lakowicz, 1999; Albani, 2004) promovido por el incremento en la concentración de PS y del GH del WPI. Sin

embargo, como se ha comentado y discutido en la Sección 5.1.1.1, los resultados obtenidos por esta técnica brindarían sólo información sobre la existencia de diferencias en el comportamiento de interacción en los sistemas mixtos pero no acerca de su naturaleza. Por lo tanto, el fenómeno de *quenching* observado podría ser solamente interpretado en términos de colisiones macromoleculares de tipo proteína-proteína y/o proteína-polisacárido favorecidas por el aumento de la concentración de PS y del GH del WPI.

5.3.1.2. Efecto de los PS sobre la fluorescencia extrínseca de hidrolizados de WPI

La Figura 5.39 presenta el efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la hidrofobicidad superficial (S_0 , u.a.) como una función del GH (0,0-5,0 %) del WPI. La adición de los PS produjo distintos efectos sobre la magnitud de S_0 dependiendo del tipo de PS, de su concentración en solución y del GH del WPI. Se observó que:

(i) En ausencia de PS, la magnitud de S_0 aumentó con el incremento del GH sugiriendo una mayor exposición de *patches* hidrofóbicos sobre la superficie del WPI. Como se ha comentado y discutido en la sección 5.2.1.2, este comportamiento podría relacionarse con la modificación estructural del WPI como consecuencia de la hidrólisis enzimática limitada.

(ii) En el rango de GH = 0,0-1,0 % (WPI y H1), el aumento de la concentración de PS produjo un incremento gradual de los valores de S_0 con respecto a las proteínas puras. La adición de AS provocó un efecto de mayor magnitud sobre S_0 comparado con el de λ -C. El aumento del valor de S_0 podría deberse a un incremento en

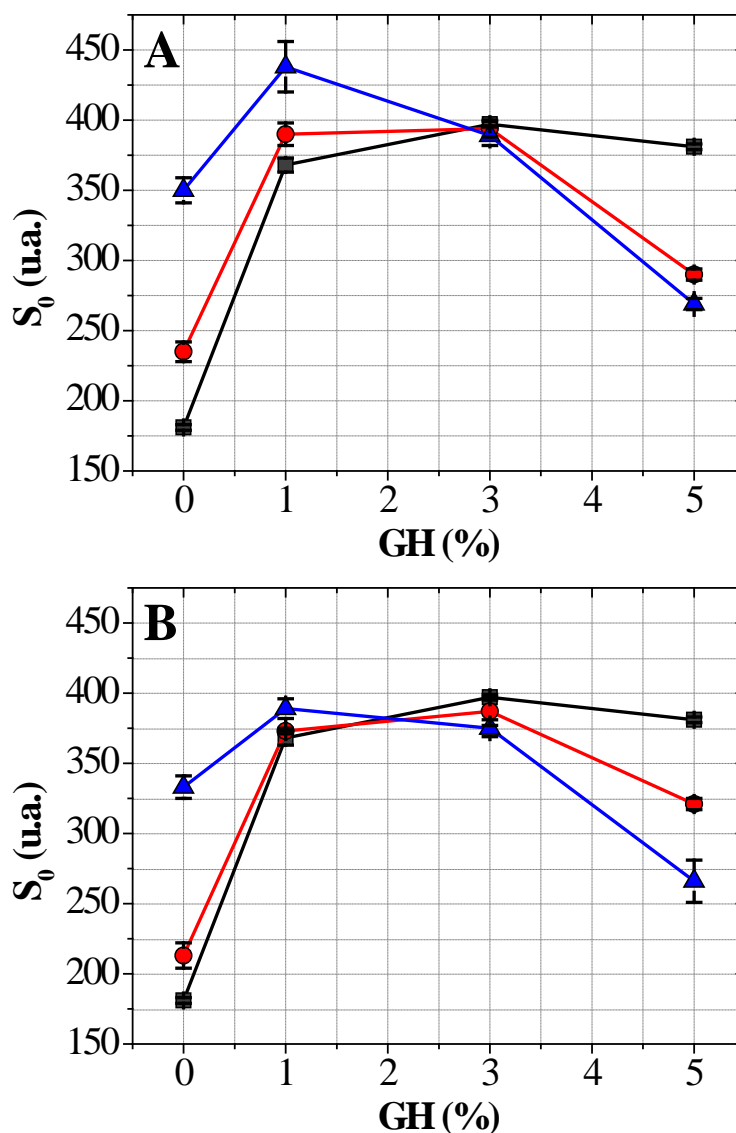


Figura 5.39. Efecto de la concentración de AS (A) y λ -C (B), en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p, sobre la hidrofobicidad superficial (S_0) como una función del GH del WPI. Sistemas Prot:PS: (■) 1,0:0,0 %p/p, (●) 1,0:0,1 %p/p, (▲) 1,0:0,5 %p/p. Temperatura 20 °C, pH 7, and I 0,05M.

el número de sitios hidrofóbicos superficiales de las proteínas debido a la modificación de la actividad termodinámica y/o conformación de la proteína en presencia de PS (Pavlovskaya y col., 1993). Como se ha mencionado y discutido en la Sección 5.1.1.2,

la elevada repulsión entre proteínas y PS podría incrementar la exposición de grupos hidrofóbicos de las proteínas resultando en una mayor interacción con el ANS y, consecuentemente, en un mayor valor de S_0 (Uruakpa y Arntfield, 2006). Luego, esta situación sería termodinámicamente desfavorable y el sistema tendería a disminuir el contacto entre los sitios hidrofóbicos expuestos y el medio acuoso por efecto hidrofóbico promoviendo fenómenos segregativos y/o favoreciendo la adsorción sobre interfaces fluidas (Grinberg y Tolstoguzov, 1997).

(iii) A nivel de un GH = 3,0 % (H2), la adición de PS (en el rango de concentración evaluado) no produjo efecto sobre el valor de S_0 .

(iv) A nivel de un GH = 5,0 % (H3), el aumento de la concentración de PS produjo una disminución gradual del valor de S_0 . La disminución del valor de S_0 podría relacionarse con una reducción de la accesibilidad de sitios hidrofóbicos expuestos en H3 para la asociación con el ANS. Como se ha discutido en la Sección 5.1.1.2, este comportamiento podría explicarse en términos de dos tipos diferentes de interacciones biopoliméricas (Galazka y col, 1999; Uruakpa y Arntfield, 2006): (a) la existencia de un fenómeno de segregación debido a la incompatibilidad termodinámica entre los biopolímeros, lo que podría conducir a una reducción de los sitios hidrofóbicos accesibles al ANS por agregación de la proteína en solución y/o (b) la existencia de un fenómeno de asociación entre la proteína y los PS lo que podría impedir estéricamente el acceso del ANS para interactuar con los sitios hidrofóbicos superficiales de la proteína. De acuerdo con los resultados comentados y discutidos en la Sección 5.1.1.3, cabría suponer que los sistemas H3/AS estén gobernados por un comportamiento de interacción tipo (a), i.e., con segregación y agregación de H3 en solución; mientras que los sistemas H3/ λ -C estén caracterizados por un comportamiento tipo (b), i.e., con

formación de complejos solubles H3- λ -C. Respecto del WPI puro y sin hidrolizar, ambos tipos de comportamientos de interacción serían factibles considerando, en primer lugar, la modificación estructural de la proteína tras la hidrólisis enzimática (reducción del tamaño molecular, exposición de *patches* hidrofóbicos, posible alteración de la carga neta superficial, etc.) y en segundo lugar, las distintas estructuras químicas de los PS. Sin embargo, estudios adicionales serían necesarios para confirmar estas hipótesis.

5.3.2. Efecto de la adición de polisacáridos sobre la dinámica interfacial de hidrolizados de WPI

5.3.2.1. Efecto de los PS sobre la dinámica de formación de películas de hidrolizados de WPI

Las Figuras 5.40 y 5.41 presentan el efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-0,5 % p/p) sobre la evolución temporal de la presión superficial (π , mN/m) de las películas de hidrolizados de WPI (GH = 0,0-5,0 %) adsorbidos sobre la interfase aire-agua. En todos los sistemas evaluados, se observó un aumento gradual de los valores de π con el incremento del tiempo de adsorción (θ). Tal como ha sido discutido en secciones previas, este fenómeno podría relacionarse con la naturaleza dinámica del proceso adsorción de proteínas sobre la interfase aire-agua (Graham y Phillips, 1979; Damodaran y Song, 1988; MacRitchie, 1990). Sin embargo, se observó que la magnitud de los valores de π en los sistemas mixtos dependió del tipo de PS, de su concentración en solución y del GH del WPI.

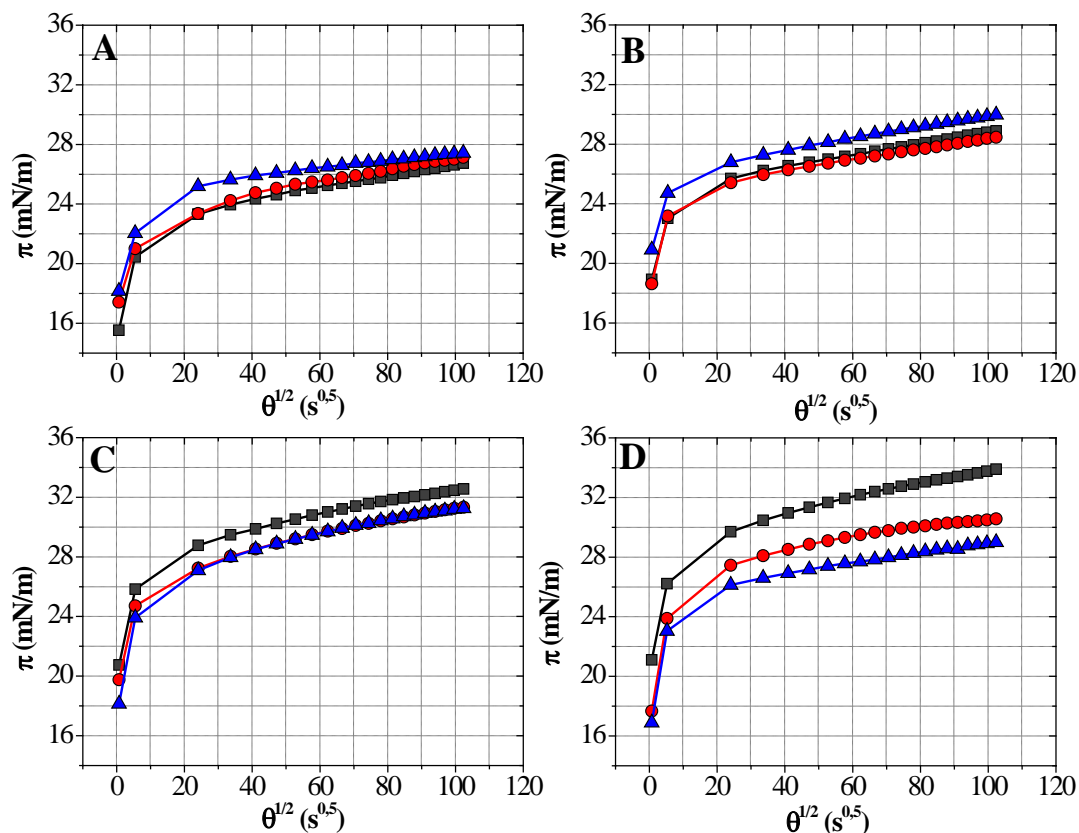


Figura 5.40. Efecto de la concentración de AS (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la evolución temporal de la presión superficial (π , mN/m) de las películas de WPI (A), H1 (B), H2 (C) y H3 (D) adsorbidos sobre la interfase aire-agua. Símbolos sistemas Prot:AS: (■) 1,0:0,0 %p/p, (●) 1,0:0,1 %p/p, (▲) 1,0:0,5 %p/p. Temperatura 20 °C, pH 7, and I 0,05M.

El efecto de la concentración de AS sobre la evolución temporal de la presión superficial (π , mN/m) de las películas interfaciales de hidrolizados de WPI (GH = 0,0-5,0 %), se presenta en la Figura 5.40. Se observó que el aumento de la concentración de AS produjo:

- (i) Un incremento en los valores de π de WPI y H1 sugiriendo la existencia de un efecto sinérgico de AS sobre la adsorción interfacial de estas proteínas (Figuras 5.40A y 5.40B).

(ii) Una disminución gradual de los valores de π de las películas de H2 y H3 adsorbidos sobre la interfase aire-agua (Figuras 5.40C y 5.40D). Este comportamiento sugeriría que la adición de AS produciría una menor adsorción de estas proteínas cuanto mayor es su concentración en el seno de solución y cuanto mayor es el GH.

Por otro lado, el efecto de la concentración de λ -C sobre la evolución temporal de la presión superficial (π , mN/m) de las películas interfaciales de hidrolizados de WPI (GH = 0,0-5,0 %), se presenta en la Figura 5.41.

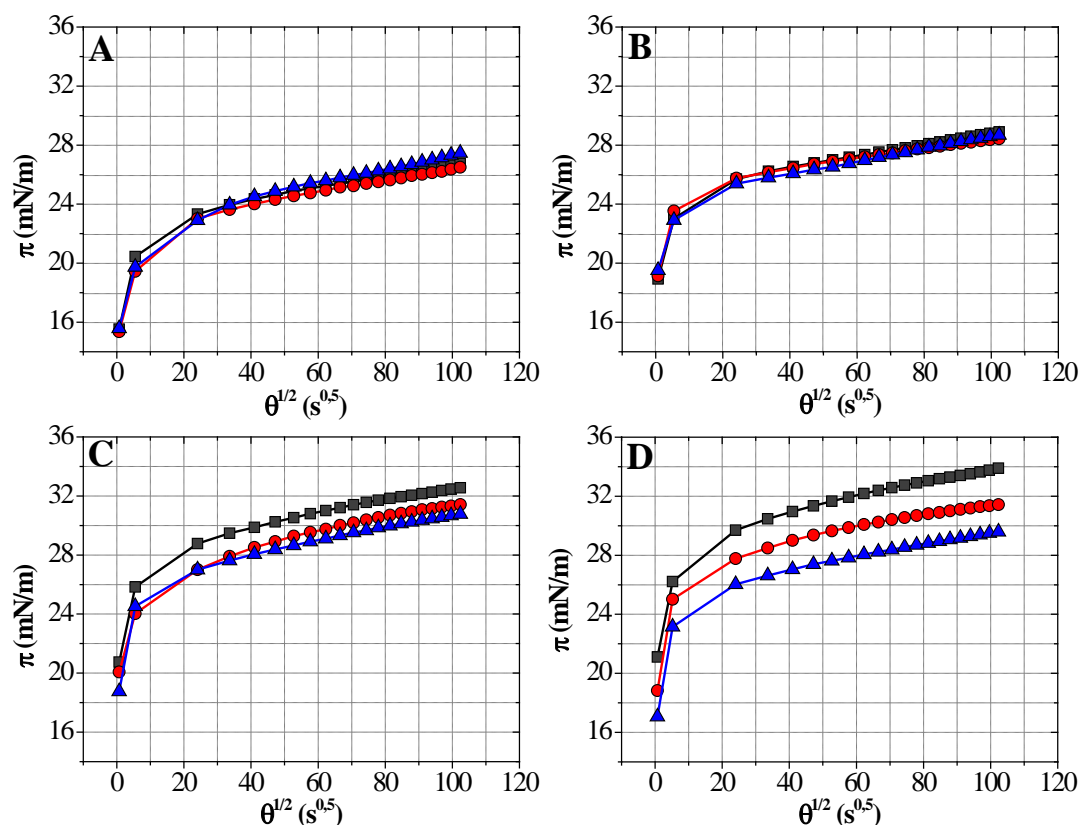


Figura 5.41. Efecto de la concentración de λ -C (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la evolución temporal de la presión superficial (π , mN/m) de las películas de WPI (A), H1 (B), H2 (C) y H3 (D) adsorbidos sobre la interfase aire-agua. Símbolos sistemas Prot:AS: (■) 1,0:0,0 %p/p, (●) 1,0:0,1 %p/p, (▲) 1,0:0,5 %p/p. Temperatura 20 °C, pH 7, and I 0,05M.

Se observó que el aumento de la concentración de λ -C produjo:

(i) Prácticamente, ningún efecto sobre los valores de π de WPI y H1 indicando que, en estas condiciones, la adición de λ -C no ejercería un efecto sobre la adsorción interfacial de estas proteínas (Figuras 5.41A y B).

(ii) Una disminución gradual de los valores de π de H2 y H3 sugiriendo una menor adsorción de estas proteínas cuanto mayor es la concentración de λ -C en el seno de solución y cuanto mayor es el GH (Figuras 5.40C y 5.40D). El mismo comportamiento fue observado en los sistemas H2/AS y H3/AS.

A partir de los resultados obtenidos, podría deducirse que la dinámica de formación de películas de hidrolizados de WPI estaría afectada por la adición de los PS y por distintos tipos de interacciones macromoleculares tanto en solución acuosa como en el entorno de la interfase aire-agua. Estas interacciones biopoliméricas podrían ejercer un rol determinante de la adsorción interfacial de los hidrolizados de WPI sobre la interfase aire-agua (tal como se ha discutido en secciones previas). El efecto de los PS sobre la dinámica de adsorción interfacial de los hidrolizados de WPI, será discutido desde un punto de vista cinético en las siguientes Secciones de la presente Tesis Doctoral.

5.3.2.2. Efecto de los PS sobre la cinética de adsorción interfacial de hidrolizados de WPI

Difusión hacia la interfase aire-agua

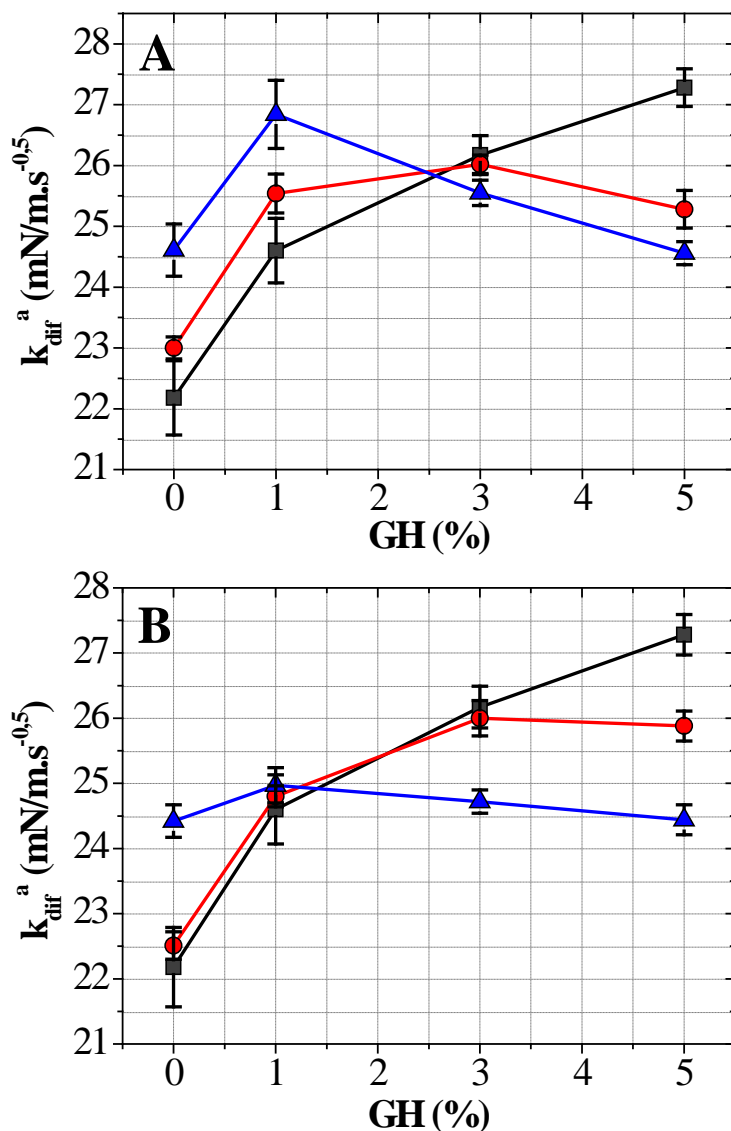


Figura 5.42. Efecto de la concentración de AS (A) y λ -C (B), en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p, sobre la constante de velocidad de difusión aparente (k_{dif}^a) como una función del GH del WPI. Símbolos sistemas Prot:PS: (■) 1,0:0,0 %p/p, (●) 1,0:0,1 %p/p, (▲) 1,0:0,5 %p/p. Temperatura 20 °C, pH 7, and I 0,05M.

La etapa de difusión de proteínas e hidrolizados desde el seno de solución hacia la interfase aire-agua constituye un paso fundamental para la adsorción interfacial a cortos

θ , dando origen a la formación de una película adsorbida, y permitiendo la formación de espumas (Miñones Conde y Rodríguez Patino, 2007; Rodríguez Patino y col., 2007b).

De manera similar a lo observado en los sistemas WPC/PS discutidos en la Sección 5.1.2.3, se observó que el paso de difusión de los hidrolizados en los sistemas mixtos fue muy rápido ($\pi > 10$ mN/m), por lo que las constantes de velocidad de difusión (k_{dif}) no pudieron ser calculadas de acuerdo a la Ecuación 4.5. En tal caso, se calculó la constante de velocidad de difusión aparente, k_{dif}^a a partir de la pendiente inicial de las curvas $\pi-\theta^{1/2}$ de las Figuras 5.40 y 5.41 (Perez y col., 2009), tal como se ha expuesto en las Secciones 5.1.2.3 y 5.2.2.3.

La Figura 5.42 presenta el efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la constante de velocidad de difusión aparente (k_{dif}^a) como una función del GH (0,0-5,0 %) del WPI. En general, se observó que la adición de PS afectó la magnitud de k_{dif}^a dependiendo del tipo de PS, de su concentración relativa y del GH del WPI. En ausencia de PS, los valores de k_{dif}^a incrementaron conforme aumentó el GH. Como se ha discutido previamente, este fenómeno podría relacionarse con: la reducción en el tamaño molecular, la mayor exposición de los *patches* hidrofóbicos y el incremento de la actividad superficial del WPI como consecuencia de la hidrólisis enzimática limitada (como puede deducirse a partir de las Figura 5.28).

La Figura 5.42A presenta el efecto de AS (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la constante de velocidad de difusión aparente (k_{dif}^a) como una función del GH (0,0-5,0 %) del WPI. Se observó que el aumento de la concentración de AS provocó un incremento de los valores de k_{dif}^a del WPI y de H1, encontrando un valor máximo en el sistema mixto H1:0,5AS (1,0:0,5 %p/p). La adición de AS en estos sistemas mixtos

podría aumentar la velocidad de difusión del WPI y de H1 debido a un aumento en el valor de S_0 (como puede deducirse a partir de la Figura 5.39A) debido a la modificación de la actividad termodinámica y/o conformación de las proteínas en presencia del polisacárido (Pavlovskaya y col., 1993). Además, este resultado fue consistente con el incremento de los valores de π (a cortos θ) tras el aumento de la concentración de AS en los sistemas WPI/AS y H1/AS (como puede deducirse a partir de las Figura 5.40A y 5.40B). Sin embargo, un comportamiento opuesto fue observado para H2 (GH = 3,0 %) y H3 (GH = 5,0 %) (Figura 5.42A). En estos casos, se observó que el aumento de la concentración de AS provocó una reducción gradual de los valores de k_{dif}^a de H2 y H3, encontrando un valor mínimo en el sistema mixto H3:0,5AS (1,0:0,5 % p/p). En estas condiciones, los efectos del aumento de la concentración de AS y del GH del WPI podrían provocar una mayor resistencia a la difusión de los hidrolizados y, consecuentemente, una disminución de su disponibilidad para la adsorción interfacial (como puede deducirse a partir de las Figura 5.40C y 5.40D). La mayor retención de los hidrolizados en la subfase acuosa podría relacionarse con la disminución de los valores de S_0 de estos sistemas mixtos debido a la existencia de interacciones macromoleculares entre los biopolímeros (como puede deducirse a partir de la Figura 5.39A).

Por otro lado, la Figura 5.42B presenta el efecto de λ -C (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la constante de velocidad de difusión aparente (k_{dif}^a) como una función del GH (0,0-5,0 %) del WPI. Se observó que en el rango de GH entre 0,0-3,0 % la adición de 0,1 %p/p de λ -C no tuvo influencia sobre el valor de k_{dif}^a de los hidrolizados; sin embargo, provocó una reducción del valor de k_{dif}^a a nivel de GH = 5,0 % (H3) respecto a la proteína pura. Además, se observó que la adición de

0,5 %p/p de λ -C provocó un importante incremento del valor de k_{dif}^a del WPI, no modificó el valor de k_{dif}^a de H1 y produjo una notable reducción el valor de k_{dif}^a a nivel del rango de GH = 3,0-5,0 % (H2 y H3) con respecto a las proteínas puras. El aumento del valor de k_{dif}^a del WPI podría vincularse con el aumento en el valor de S_0 de este sistema (como puede deducirse a partir de la Figura 5.39B) como consecuencia de la modificación de la actividad termodinámica de la proteína en presencia del polisacárido (Pavlovskaya y col., 1993). Por otra parte, la reducción de los valores de k_{dif}^a de H2 y H3 indicaría una menor disponibilidad de estos hidrolizados para su adsorción interfacial (como puede deducirse a partir de las Figuras 5.41C y 5.41D). Al igual que para el caso de AS, este comportamiento podría explicarse en términos de la disminución de los valores de S_0 de estos sistemas mixtos (como puede deducirse a partir de la Figura 5.39B) y de la mayor retención de los hidrolizados debido a la existencia de interacciones macromoleculares entre los biopolímeros en la subfase acuosa.

Similarmente a los sistemas WPC/PS (Sección 5.1.2.3), la velocidad de difusión de los hidrolizados en presencia de los PS estuvo relacionada con la magnitud de su hidrofobicidad superficial (S_0). Esta relación se presenta en la Figura 5.43. Nuevamente, a partir de esta relación podría deducirse que los factores que promueven bajos valores de S_0 (e.g., formación de complejos solubles y/o segregación con agregación de la proteína en solución), provocarían una disminución en la velocidad de difusión de los hidrolizados. Sin embargo, los factores que promueven elevados valores de S_0 (e.g., elevada exposición de *patches* hidrofóbicos de la proteína debido a la elevada repulsión entre los biopolímeros) provocarían un incremento en la velocidad de difusión de los hidrolizados hacia la interfase. Por lo tanto, se podría concluir que las

distintas interacciones macromoleculares entre los hidrolizados de WPI y los PS en la subfase acuosa podrían ejercer una importante influencia sobre la difusión de los hidrolizados y, consecuentemente, en la formación de sus películas interfaciales.

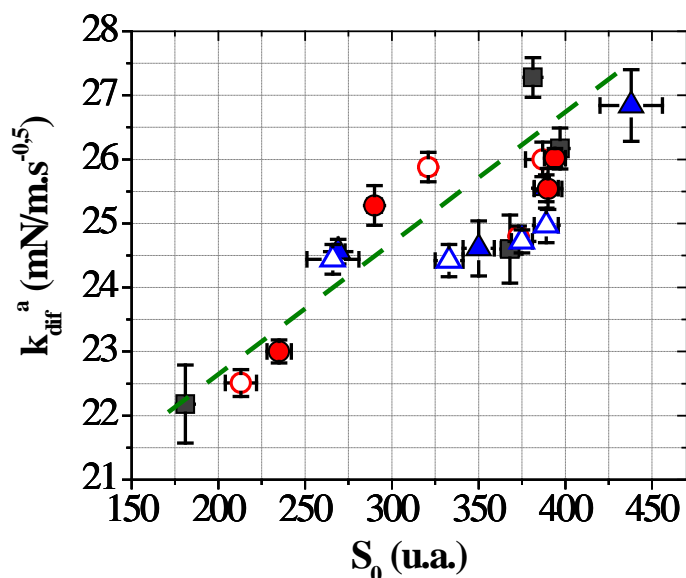


Figura 5.43. Relación entre la hidrofobicidad superficial (S_0) con la velocidad de difusión aparente (k_{diff}^a) para los sistemas Prot:Ps: 1,0:0,0 %p/p (■), 1,0:0,1 %p/p (AS ●, λ -C ○), 1,0:0,5 %p/p (AS ▲, λ -C △). Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05 M.

Penetración y reordenamiento

El efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre las constantes de velocidad de penetración molecular (k_p) y reordenamiento configuracional (k_R) de segmentos adsorbidos como una función del GH (0,0-5,0 %) del WPI, se presenta en las Figuras 5.44 y 5.45, respectivamente. Se observó que el modelo cinético propuesto (Ecuación 4.6) fue adecuado para describir la adsorción de estos sistemas a largos θ ($R \geq 0,981$) (Graham y Phillips, 1979; Suttiprasit y col., 1992). En

presencia de los PS, se observó que la magnitud de los valores de k_P y k_R estuvo fuertemente afectada por el tipo de PS, su concentración en solución y por el GH del WPI.

Las Figuras 5.44A y 5.45A presentan el efecto de AS (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la magnitud de las constantes de velocidad de penetración (k_P) y reordenamiento (k_R) como una función del GH (0,0-5,0 %) del WPI, respectivamente. Se observó que los valores de k_P y k_R del WPI no se modificaron en presencia de AS en el rango de concentración evaluado; sin embargo, los valores de k_P y k_R de H1 aumentaron levemente conforme aumentó la concentración de AS en el seno de solución. Este comportamiento podría estar vinculado con la mayor velocidad de difusión de H1 en presencia de AS (como puede deducirse a partir de la Figura 5.42A) lo que podría promover mayores velocidades de penetración y reordenamiento configuracional de sus segmentos adsorbidos. Sin embargo, un comportamiento antagónico fue observado con el incremento del GH del WPI. En estas condiciones, la presencia de AS provocó una reducción de los valores de k_P y k_R , fundamentalmente en los sistemas mixtos conteniendo H3. Este comportamiento podría relacionarse con la menor velocidad de difusión de estos sistemas, tal como fue discutido en la sección previa.

Por lo tanto, a partir de estos resultados, podría deducirse que la velocidad con la que los hidrolizados penetran y se reordenan en la interfase podría también depender de la naturaleza de las interacciones macromoleculares entre los biopolímeros en la subfase acuosa, las que a su vez dependerían de la concentración relativa de AS, del cambio estructural de la proteína (a consecuencia de la hidrólisis enzimática limitada) y/o del efecto combinado de ambos factores.

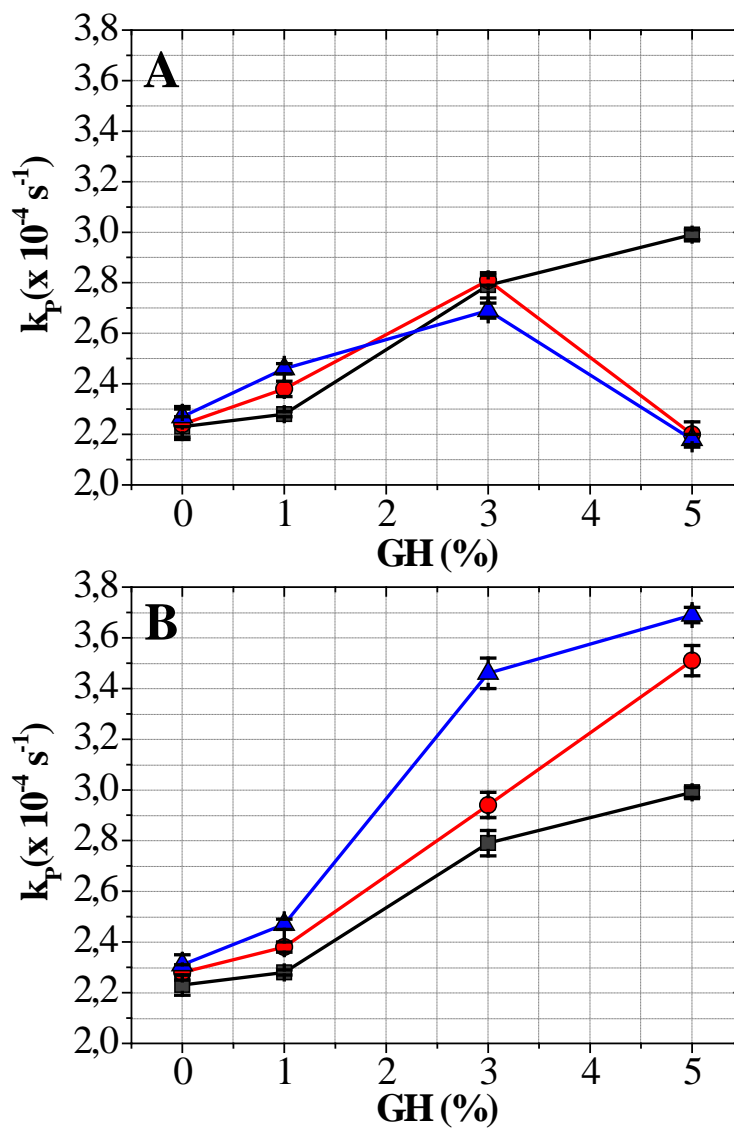


Figura 5.44. Efecto de la concentración de AS (A) y λ -C (B), en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p, sobre la constante de velocidad de penetración molecular (k_p) como una función del GH del WPI. Símbolos sistemas Prot:PS: (■) 1,0:0,0 %p/p, (●) 1,0:0,1 %p/p, (▲) 1,0:0,5 %p/p. Temperatura 20 °C, pH 7, and I 0,05M.

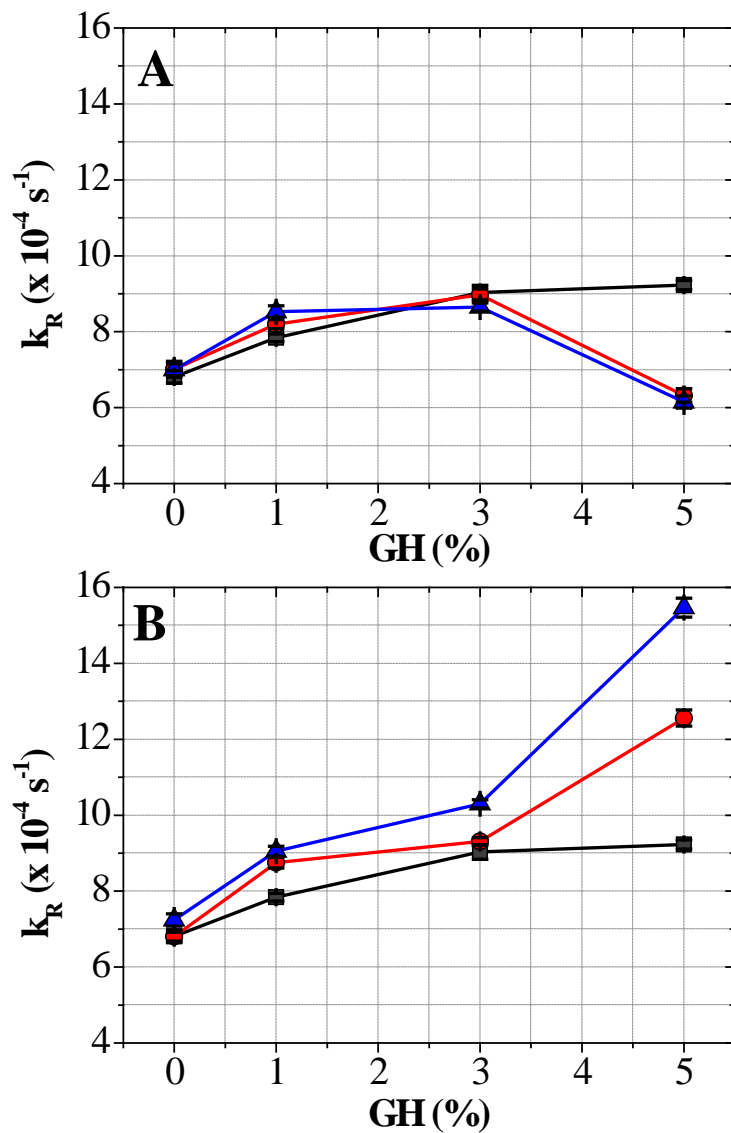


Figura 5.45. Efecto de la concentración de AS (A) y λ -C (B), en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p, sobre la constante de velocidad de reordenamiento configuracional (k_R) como una función del GH del WPI. Símbolos sistemas Prot:PS: (■) 1,0:0,0 %p/p, (●) 1,0:0,1 %p/p, (▲) 1,0:0,5 %p/p. Temperatura 20 °C, pH 7, and I 0,05M.

Por otro lado, las Figuras 5.44B y 5.45B presentan el efecto de λ -C (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la magnitud de las constantes de velocidad de penetración (k_P) y reordenamiento (k_R) como una función del GH (0,0-5,0 %) del WPI, respectivamente. Al igual que para los sistemas mixtos conteniendo AS, se observó que los valores de k_P y k_R del WPI sin hidrolizar no se modificaron en presencia λ -C. Además, se observó que los valores de k_P y k_R de los hidrolizados (H1, H2 y H3) aumentaron conforme aumentó la concentración de λ -C en el seno de solución produciendo un efecto sinérgico sobre la magnitud de estos parámetros cinéticos. A pesar de la existencia de una menor velocidad de difusión en los sistemas H2/ λ -C y H3/ λ -C (como puede deducirse a partir de la Figura 5.42B), las características cinéticas interfaciales a largos θ podrían potenciarse con el aumento de la concentración relativa de λ -C, el mayor cambio estructural de la proteína (a consecuencia de la hidrólisis enzimática limitada) y/o del efecto combinado de ambos factores. Similarmente a los sistemas WPC/ λ -C (Sección 5.1.2.3), estos resultados sugerirían la existencia de interacciones macromoleculares sinérgicas entre los hidrolizados y λ -C, tanto en solución como en el entorno de la interfase aire-agua.

Finalmente, en todos los casos, se observó que los valores de k_P fueron menores a los de k_R , lo que sugeriría que el paso de penetración sería la etapa limitante del proceso de adsorción interfacial de los sistemas mixtos formulados con hidrolizados de WPI y PS.

5.3.2.3. Efecto de los PS sobre las características dilatacionales superficiales de películas de hidrolizados de WPI

El efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la evolución temporal de los parámetros reológicos dilatacionales superficiales (E , E_d , E_v y ϕ) de las películas de hidrolizados de WPI (GH = 0,0-5,0 %) adsorbidos sobre la interfase aire-agua se presenta en las Figuras A2.4-7 del Apéndice II. A partir de las mismas se pudo observar que: (i) los valores de E y E_d fueron altos y similares y (ii) los valores de E_v y ϕ fueron bajos, fundamentalmente, a largos θ . Por lo tanto, como consecuencia de este comportamiento reológico podría concluirse que las características dilatacionales superficiales de los sistemas mixtos formulados con PS e hidrolizados de WPI fueron esencialmente elásticas a nivel de la frecuencia angular (ω) aplicada (100 mHz) y especialmente a largos θ . Además, se observó que los valores de E y E_d aumentaron y que los valores de E_v y ϕ disminuyeron con el incremento de θ . Este fenómeno podría relacionarse con la adsorción interfacial de las proteínas pero, principalmente, podría ser vinculado con un incremento del carácter elástico (sólido) de las películas debido a un aumento en el número de interacciones entre segmentos adsorbidos (Graham y Phillips, 1979; Damodaran y Song, 1988; MacRitchie, 1990). Sin embargo, la magnitud de dichos parámetros reológicos dependió fuertemente del tipo de PS, de su concentración relativa en solución y del GH del WPI.

El efecto de AS (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la evolución temporal de la elasticidad dilatacional, E_d (mN/m), y el ángulo de fase, ϕ , de las películas de hidrolizados de WPI (GH = 0,0-5,0 %) adsorbidos sobre la interfase aire-agua se presenta en las Figuras 5.46 y 5.47, respectivamente. Se observó que el aumento de la concentración de AS produjo:

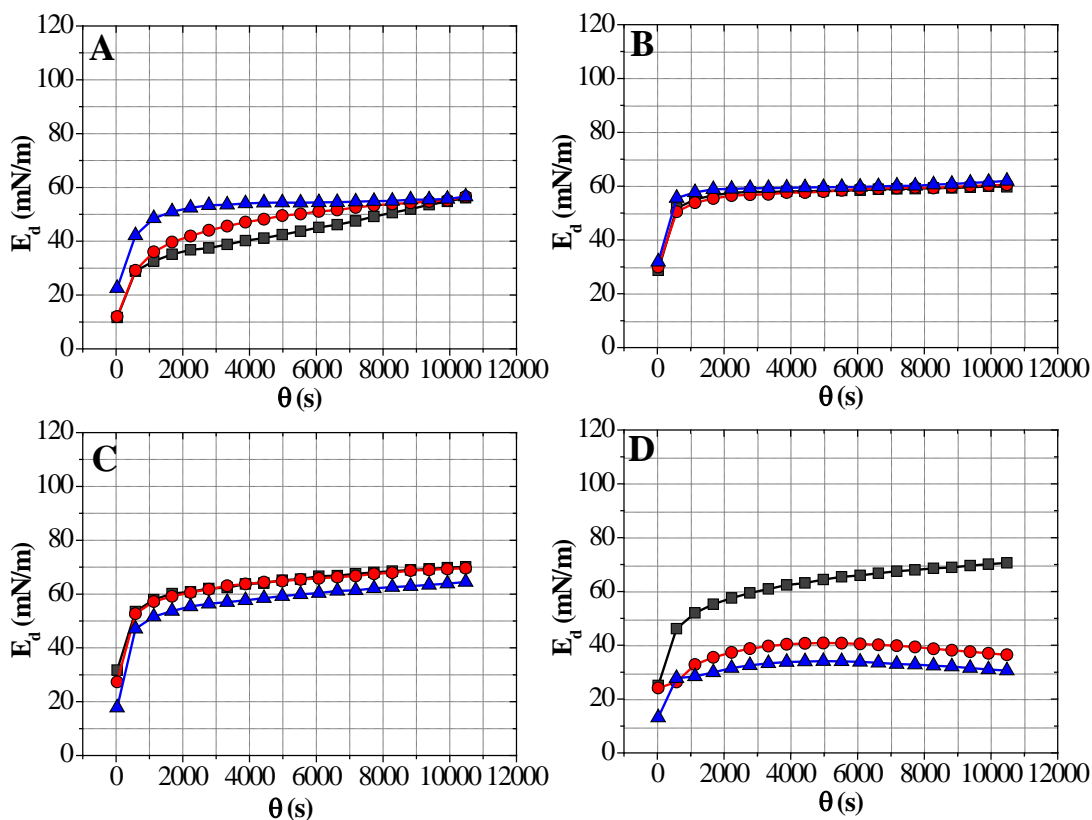


Figura 5.46. Efecto de la concentración de AS (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la evolución temporal de la elasticidad dilatacional superficial (E_d , mN/m) de las películas de WPI (A), H1 (B), H2 (C) y H3 (D) adsorbidos sobre la interfase aire-agua. Símbolos sistemas Prot:AS: (■) 1,0:0,0 %p/p, (●) 1,0:0,1 %p/p, (▲) 1,0:0,5 %p/p. Amplitud de deformación ($\Delta A/A$) 10 %, Frecuencia angular (ω) 100 mHz, Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05M.

(i) Un incremento gradual de los valores de E_d y una disminución de los valores de ϕ de la película adsorbida de WPI, (Figura 5.46A y 5.47A) indicando la existencia de un efecto sinérgico en la adsorción interfacial y/o un aumento en el número de interacciones entre segmentos de WPI adsorbidos (Rodríguez Patino y Rodríguez Niño, 1999; Rodríguez Patino y col., 2007a), principalmente, a cortos θ . Además, este comportamiento podría vincularse con el incremento de la velocidad de

difusión del WPI (como puede deducirse a partir de la Figura 5.42A). Sin embargo, a largos θ , la presencia de AS no modificó la elasticidad dilatacional superficial y la viscoelasticidad relativa de la película adsorbida de WPI. Este último comportamiento podría vincularse con la magnitud de los valores de k_P y k_R para los sistemas WPI/PS discutidos en la sección previa.

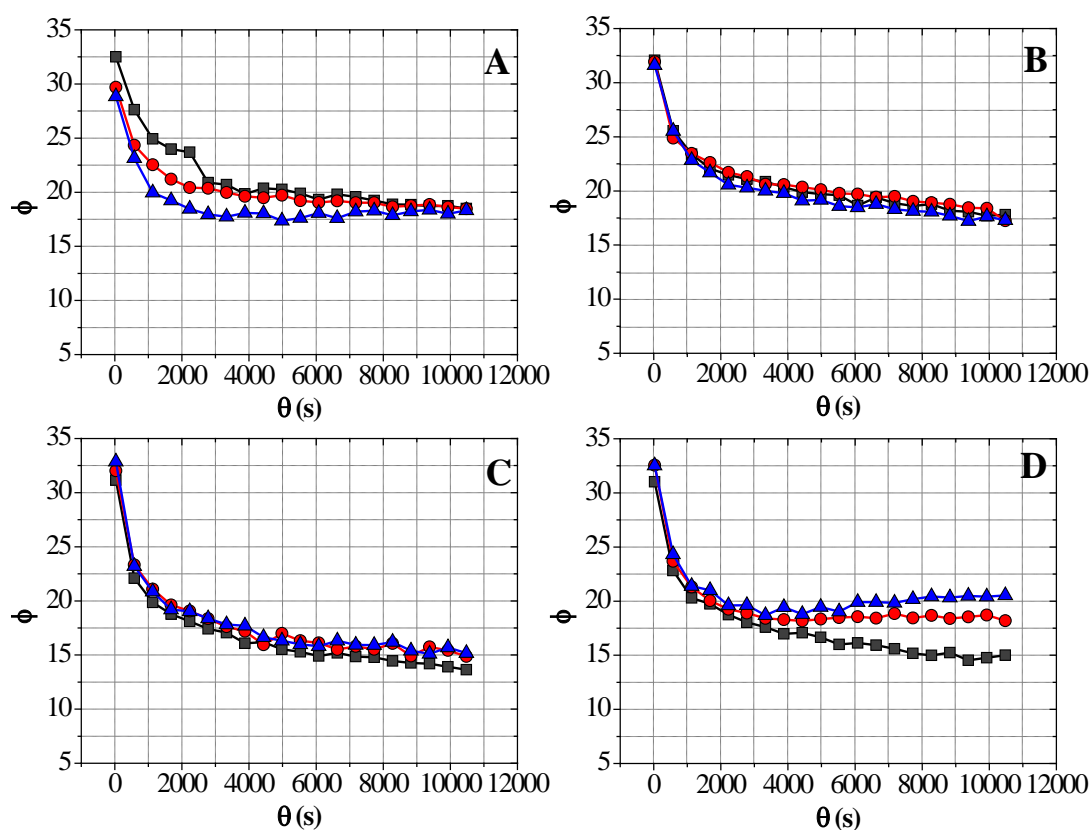


Figura 5.47. Efecto de la concentración de AS (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la evolución temporal del ángulo de fase (ϕ , mN/m) de las películas de WPI (A), H1 (B), H2 (C) y H3 (D) adsorbidos sobre la interfase aire-agua. Símbolos sistemas Prot:AS: (■) 1,0:0,0 %p/p, (●) 1,0:0,1 %p/p, (▲) 1,0:0,5 %p/p. Amplitud de deformación ($\Delta A/A$) 10 %, Frecuencia angular (ω) 100 mHz, Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05M.

(ii) Prácticamente no modificó los valores de E_d y de ϕ de las películas de H1 (Figura 5.46B y 5.47B).

(iii) Una disminución gradual de los valores de E_d y un aumento progresivo en los valores de ϕ de las películas de H2 y H3 con el aumento de θ (Figura 5.46C-D y 5.47c-d). Este comportamiento sugeriría la existencia de una reducción en el número de interacciones entre segmentos adsorbidos y/o un aumento del carácter viscoso (líquido) de las películas. Estos resultados podrían relacionarse con la reducción observada en los valores de los parámetros cinéticos k_P y k_R (como puede deducirse a partir de las Figuras 5.44A y 5.45A).

Por otro lado, las Figuras 5.48 y 5.49 presentan el efecto de λ -C (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la evolución temporal de la componente elástica o elasticidad dilatacional, E_d (mN/m), y el ángulo de fase, ϕ , de las películas de hidrolizados de WPI (GH = 0,0-5,0 %) adsorbidos sobre la interfase aire-agua, respectivamente. Se observó que el aumento de la concentración de λ -C provocó:

(i) Un incremento gradual de los valores de E_d y una disminución de los valores de ϕ de la película adsorbida de WPI, principalmente a cortos θ (Figura 5.48A y 5.49A). El comportamiento de estos sistemas mixtos fue similar al observado en los sistemas WPI/AS, discutido previamente.

(ii) Un incremento de los valores de E_d y una disminución gradual de ϕ de las películas interfaciales de hidrolizados (H1, H2 y H3), fundamentalmente a largos θ (Figura 5.48B-D y 5.49B-D). A la mayor concentración de λ -C y al mayor GH del WPI se observó un máximo valor de E_d y un mínimo valor de ϕ indicando la existencia de un importante efecto sinérgico sobre la elasticidad dilatacional y viscoelasticidad relativa

de las películas de H3. Este comportamiento podría explicarse considerando un aumento gradual en el número de interacciones entre segmentos adsorbidos (Rodríguez Patino y Rodríguez Niño, 1999; Rodríguez Patino y col., 2007a), el que podría estar promovido por un incremento en las velocidades de penetración y reordenamiento configuracional (k_P y k_R), tal como ha sido discutido en la sección previa.

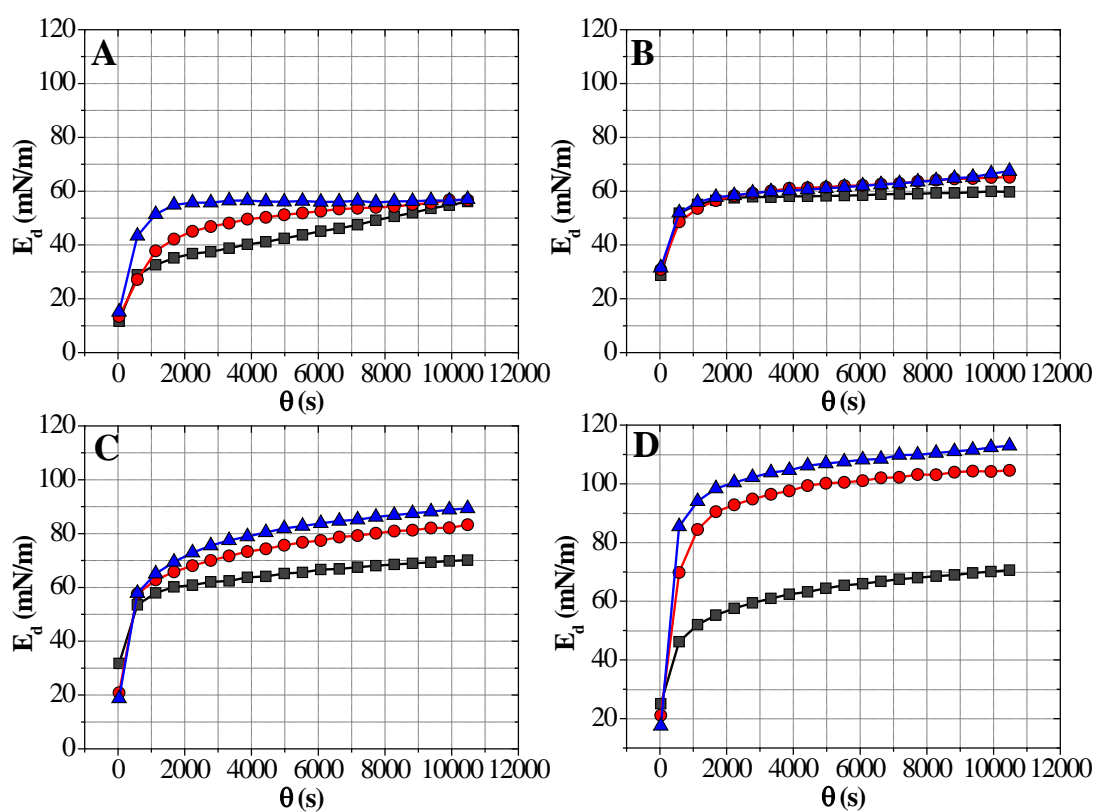


Figura 5.48. Efecto de la concentración de λ -C (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la evolución temporal de la elasticidad dilatacional superficial (E_d , mN/m) de las películas de WPI (A), H1 (B), H2 (C) y H3 (D) adsorbidos sobre la interfase aire-agua. Símbolos sistemas Prot: λ -C: (■) 1,0:0,0 %p/p, (●) 1,0:0,1 %p/p, (▲) 1,0:0,5 %p/p. Amplitud de deformación ($\Delta A/A$) 10 %, Frecuencia angular (ω) 100 mHz, Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05M

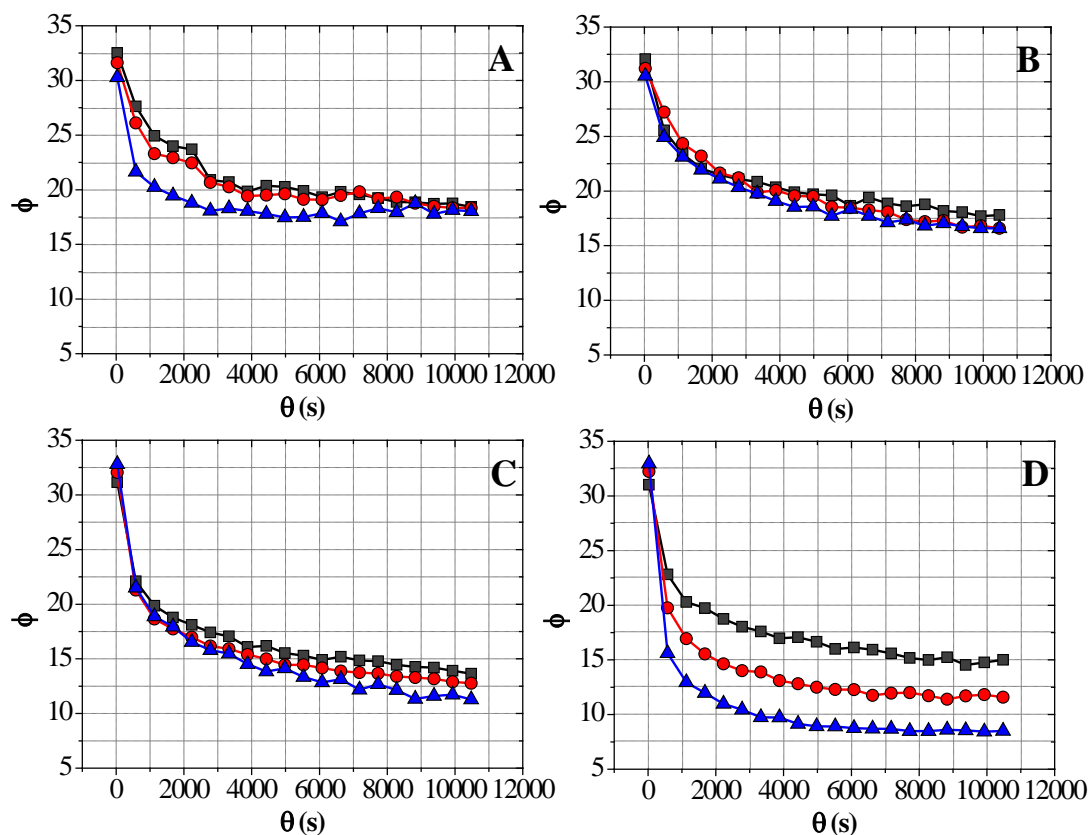


Figura 5.49. Efecto de la concentración de λ -C (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la evolución temporal del ángulo de fase (ϕ , mN/m) de las películas de WPI (A), H1 (B), H2 (C) y H3 (D) adsorbidos sobre la interfase aire-agua. Símbolos sistemas Prot: λ -C: (■) 1,0:0,0 %p/p, (●) 1,0:0,1 %p/p, (▲) 1,0:0,5 %p/p. Amplitud de deformación ($\Delta A/A$) 10 %, Frecuencia angular (ω) 100 mHz, Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05M.

5.3.2.4. Efecto de los PS sobre la estructuración interfacial de hidrolizados de WPI

Las Figuras 5.50 y 5.51 presentan el efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la estructuración interfacial de las películas de hidrolizados de WPI (GH = 0,0-5,0 %) adsorbidos sobre la interfase aire-agua.

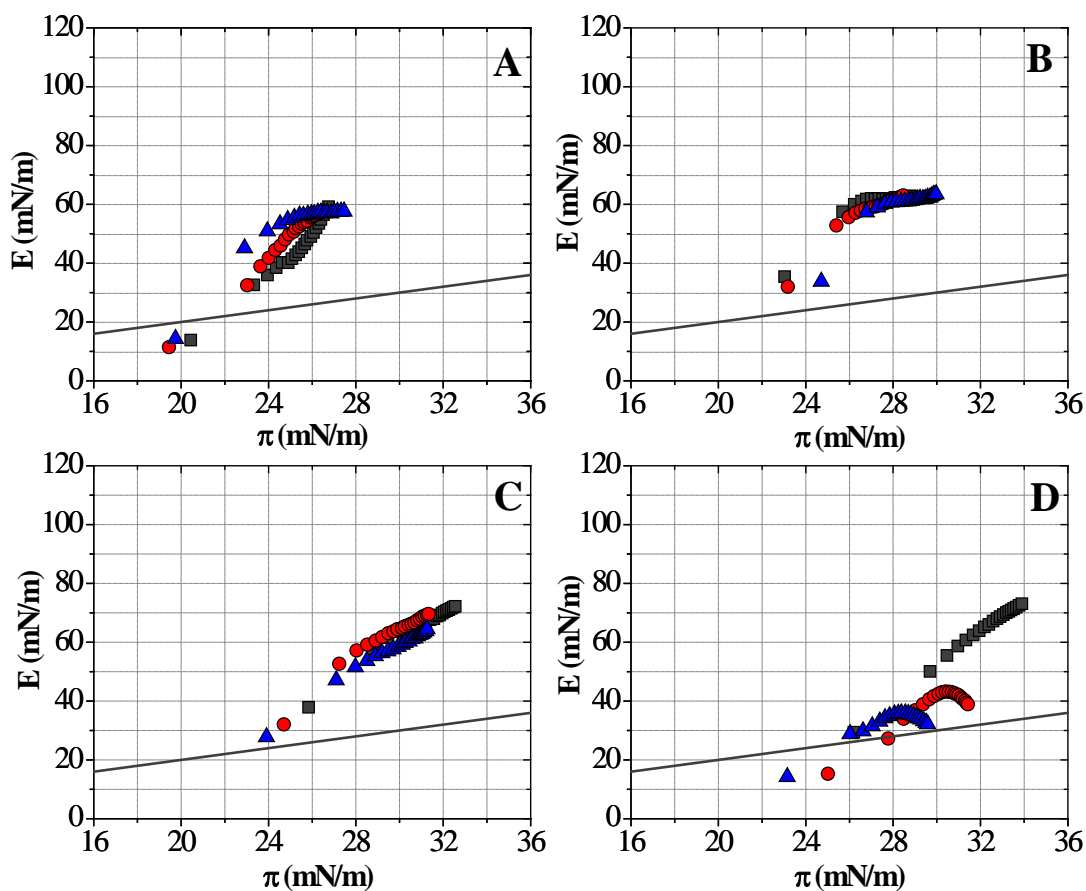


Figura 5.50. Efecto de la concentración de AS (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la estructuración interfacial (representada por la curva máster E - π) de las películas de WPI (A), H1 (B), H2 (C) y H3 (D) adsorbidos sobre la interfase aire-agua. Símbolos sistemas Prot:AS: (■) 1,0:0,0 %p/p, (●) 1,0:0,1 %p/p, (▲) 1,0:0,5 %p/p. Amplitud de deformación ($\Delta A/A$) 10 %, Frecuencia angular (ω) 100 mHz, Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05M.

Como se ha comentado en varias Secciones de la presente Tesis Doctoral, la estructuración interfacial podría ser representada por la curva E - π . En general, se observó que dichas curvas se ubicaron por arriba de la línea que denota el comportamiento ideal de las películas (línea sólida en las Figuras 5.50 y 5.51) y que la pendiente de las mismas fue mayor que la unidad, lo que sugeriría la existencia de un

gran número de interacciones entre segmentos adsorbidos (Lucassen Reynders y col., 1975; Rodríguez Patino y col., 1999, 2003).

Además, se observó que estas curvas no se normalizaron con las curvas $E-\pi$ del WPI e hidrolizados puros indicando que los segmentos hidrofóbicos podrían adsorberse con diferentes grados de estructuración (empaquetamiento) y/o condensación sobre la interfase (Rodríguez Patino y col., 2003; Miñones Conde y Rodríguez Patino, 2005), dependiendo del tipo de PS, de su concentración relativa y, fundamentalmente, del GH del WPI.

El efecto de AS (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la estructuración interfacial de las películas de hidrolizados de WPI (GH = 0,0-5,0 %) adsorbidos sobre la interfase aire-agua, se presenta en la Figura 5.50. Se observó que el aumento de la concentración de AS produjo:

(i) Un desplazamiento gradual de la curva máster del WPI hacia regiones de altos valores de E , especialmente a bajos valores de π (Figura 5.50A), indicando que, en estas condiciones, podría existir un efecto sinérgico sobre las interacciones macromoleculares entre segmentos adsorbidos (como también puede deducirse a partir de las Figuras 5.40A, 5.46A y 5.47A).

(ii) Un leve efecto sobre los valores de la curva $E-\pi$ de H1 (Figura 5.49B).

(iii) Un desplazamiento gradual de las curvas $E-\pi$ de H2 y H3, ubicándose en regiones de bajos valores de E (Figuras 5.49C y D). Además, se observó, que los valores de E alcanzaron un valor máximo a nivel de $\pi \approx 28$ mN/m para el sistema H3:0,1AS (1,0:0,1 %p/p) y a nivel de $\pi \approx 30$ mN/m para el sistema H3:0,5AS (1,0:0,5 %p/p), a partir de los cuales los valores de E disminuyeron (Figura 5.49D). Como se ha

comentado y discutido en la Sección 5.1.2.5, estos valores de π podrían considerarse valores críticos de presión superficial (π_c) asociados con una transición en el comportamiento viscoelástico de la película de H3 (Bos y van Vliet, 2001). Además, se observó que estos valores de π_c estuvieron por debajo de su valor de “pseudoequilibrio” (34 mN/m) (como puede deducirse a partir de la Figura 5.40D). Por lo tanto, a $\pi > \pi_c$ podría tener lugar el colapso de la película de H3 adsorbido sobre la interfase aire-agua y el deterioro de las características elásticas (aumento del carácter viscoso) de la misma debido a la reducción en el número de interacciones entre segmentos adsorbidos promovido por el aumento de la concentración de AS y del GH del WPI.

Para estos sistemas mixtos, la existencia de interacciones macromoleculares entre los biopolímeros (tanto en solución como en el entorno de la interfase) que promueven bajos valores de los parámetros cinéticos de adsorción interfacial (k_P y k_R) podrían luego deteriorar sus propiedades elásticas (sólidas) y, consecuentemente, alterar la estructuración interfacial de las películas de hidrolizados tras el incremento de la concentración relativa de AS, la mayor modificación estructural debido a la hidrólisis enzimática limitada y/o debido al efecto combinado de estos factores.

Por otro lado, la Figura 5.51 presenta el efecto de λ -C (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la estructuración interfacial de las películas de hidrolizados de WPI (GH = 0,0-5,0 %) adsorbidos sobre la interfase aire-agua. Se observó que el aumento de la concentración de λ -C provocó:

(i) Un desplazamiento de la curva E- π del WPI hacia regiones de altos valores de E, fundamentalmente, a nivel de bajos valores de π (Figura 5.50A), indicando la existencia de un efecto sinérgico de λ -C sobre las interacciones

macromoleculares entre segmentos adsorbidos (como también puede deducirse a partir de las Figura 5.47A y 5.48A). El comportamiento de estos sistemas mixtos fue similar al observado en los sistemas WPI/AS, discutido previamente.

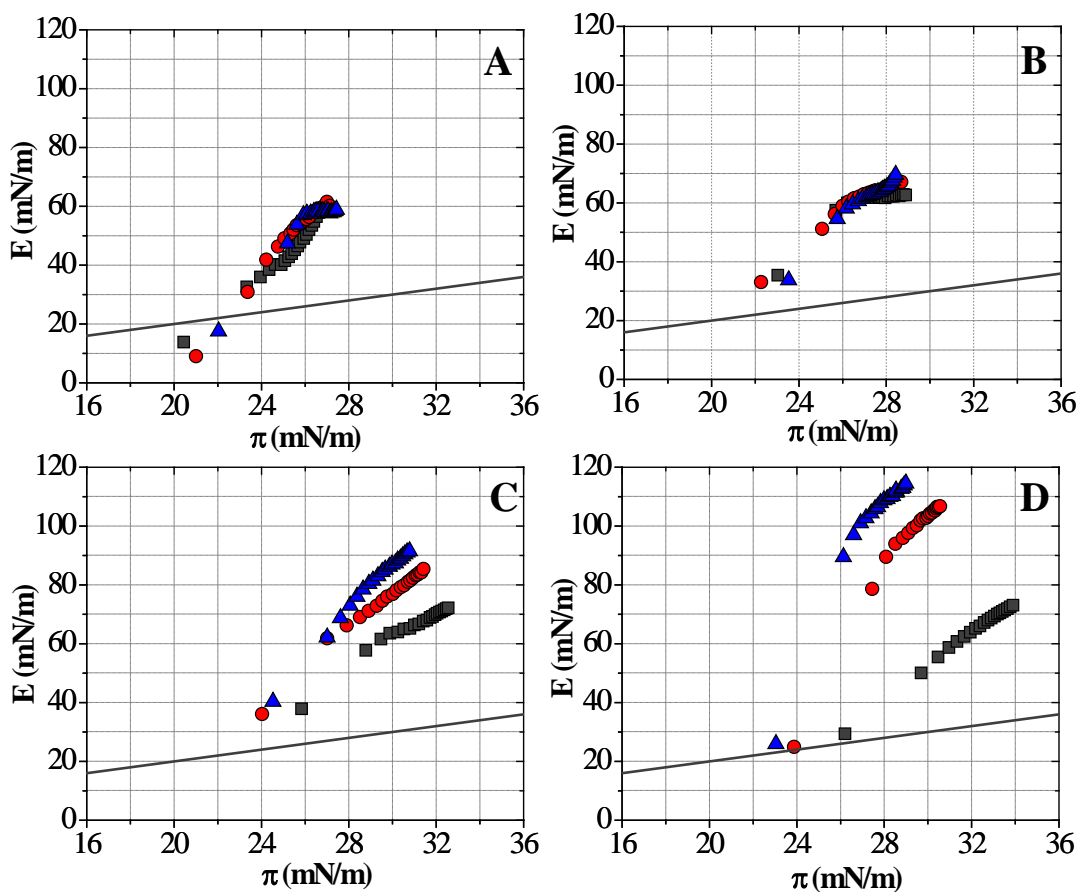


Figura 5.51. Efecto de la concentración de λ -C (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la estructuración interfacial (representada por la curva máster E - π) de las películas de WPI (A), H1 (B), H2 (C) y H3 (D) adsorbidos sobre la interfase aire-agua. Símbolos sistemas Prot: λ -C: (■) 1,0:0,0 %p/p, (●) 1,0:0,1 %p/p, (▲) 1,0:0,5 %p/p. Amplitud de deformación ($\Delta A/A$) 10 %, Frecuencia angular (ω) 100 mHz, Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05M.

(ii) Un leve efecto sobre los valores de la curva E- π de H1, principalmente a elevados valores de π , donde se registró un pequeño desplazamiento de las curvas hacia mayores de E (Figura 5.50B).

(iii) Un desplazamiento gradual de las curvas E- π de H2 y H3 ubicándose en regiones de elevados valores de E (Figura 5.50C y D) indicando un gran aumento en el número de interacciones entre segmentos adsorbidos promovido, además, por el incremento del GH.

Tal como ha sido discutido en la sección previa, estos resultados confirmarían la existencia de un efecto sinérgico de las interacciones macromoleculares entre los biopolímeros (tanto en solución como en el entorno de la interfase) sobre los parámetros cinéticos de adsorción (k_P y k_R), sobre las propiedades elásticas (sólidas) y, consecuentemente, sobre la estructuración interfacial de las películas, favorecidos con el aumento de la concentración relativa de λ -C, la mayor alteración estructural del WPI (como consecuencia de la hidrólisis enzimática limitada) y/o debido a un efecto combinado de estos factores.

5.3.3. Efecto de la adición de polisacáridos sobre las propiedades espumantes de hidrolizados de WPI

5.3.3.1. Efecto de los PS sobre la formación de espumas de hidrolizados de WPI

El efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-0,5 % p/p) sobre la capacidad espumante global (OFC, ml/s) como una función del GH (0,0-5,0 %) del

WPI, se presenta en la Figura 5.52. Como ha sido discutido previamente, en ausencia de PS, un pequeño GH podría ser suficiente para provocar un incremento en la magnitud de OFC y de C_f del WPI permaneciendo prácticamente constante tras el aumento del GH. No obstante, en presencia de los PS, se observó que la magnitud de OFC y C_f de los hidrolizados dependió fuertemente del tipo de PS, de su concentración en solución y del GH del WPI.

La Figura 5.52A presenta el efecto de AS (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la magnitud de OFC como una función del GH (0,0-5,0 %) del WPI. Se observó que el aumento de la concentración de AS produjo:

(i) Un incremento gradual de los valores de OFC del WPI y de H1. Este comportamiento podría relacionarse con el incremento de la velocidad de difusión de los sistemas WPI/AS y H1/AS (como puede deducirse a partir de la Figura 5.42A).

Una disminución gradual de los valores de OFC de H2 y H3; un comportamiento que también podría asociarse con la menor velocidad de difusión de estos sistemas mixtos (como puede deducirse a partir de las Figuras 5.39A y 5.42A).

Por otro lado, la Figura 5.52B presenta el efecto de λ -C (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la magnitud de OFC como una función del GH (0,0-5,0 %) del WPI. Se observó que:

(i) La presencia de λ -C prácticamente no produjo efecto sobre la magnitud de los valores de OFC del WPI y de los hidrolizados (H1, H2 y H3), principalmente, a la más baja concentración de polisacárido evaluada (0,1 %p/p).

(ii) El aumento de la concentración de λ -C provocó una disminución en la magnitud de OFC de H2 y H3; un comportamiento que podría ser vinculado con la

menor velocidad de difusión de los sistemas H2/ λ -C y H3/ λ -C (como puede deducirse a partir de las Figuras 5.39B y 5.42B).

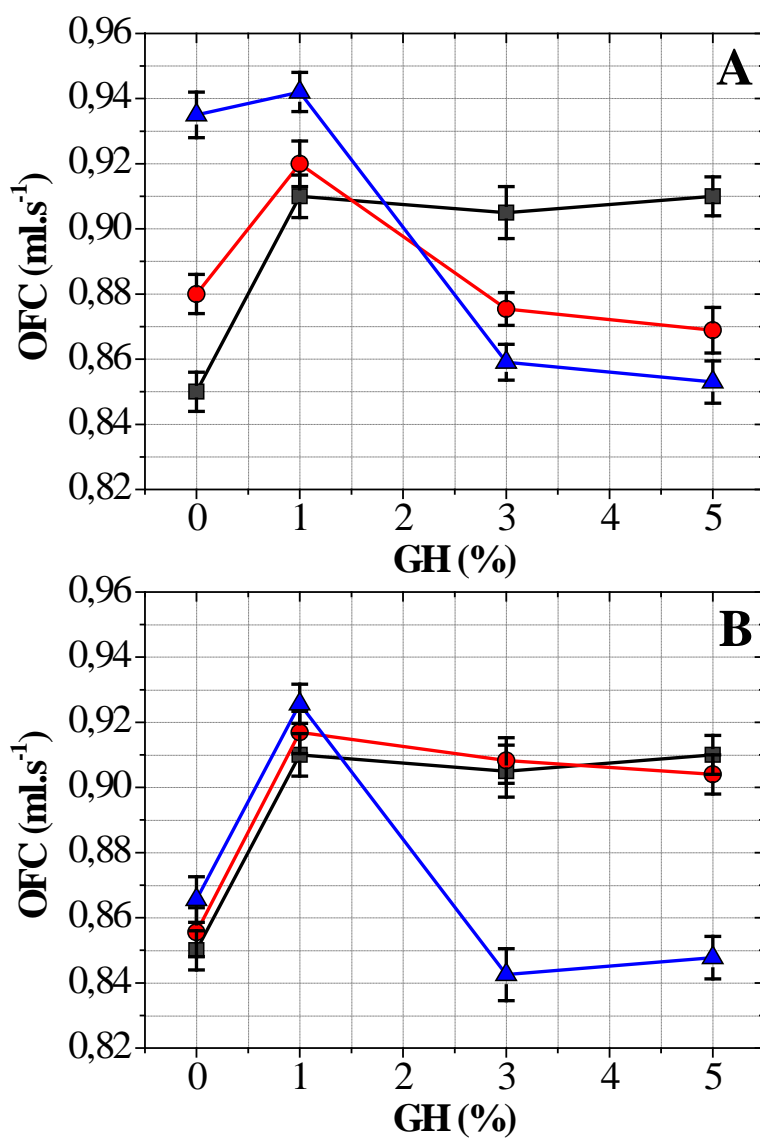


Figura 5.52. Efecto de la concentración de AS (A) y λ -C (B), en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p, sobre la capacidad espumante global (OFC, ml/s) como una función del GH del WPI. Símbolos sistemas Prot:PS: (■) 1,0:0,0 %p/p, (●) 1,0:0,1 %p/p, (▲) 1,0:0,5 %p/p. Temperatura 20 °C, pH 7, and I 0,05M.

La Figura 5.53 presenta el efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la conductividad relativa (C_f , %) de las espumas como una función del GH (0,0-5,0 %) del WPI.

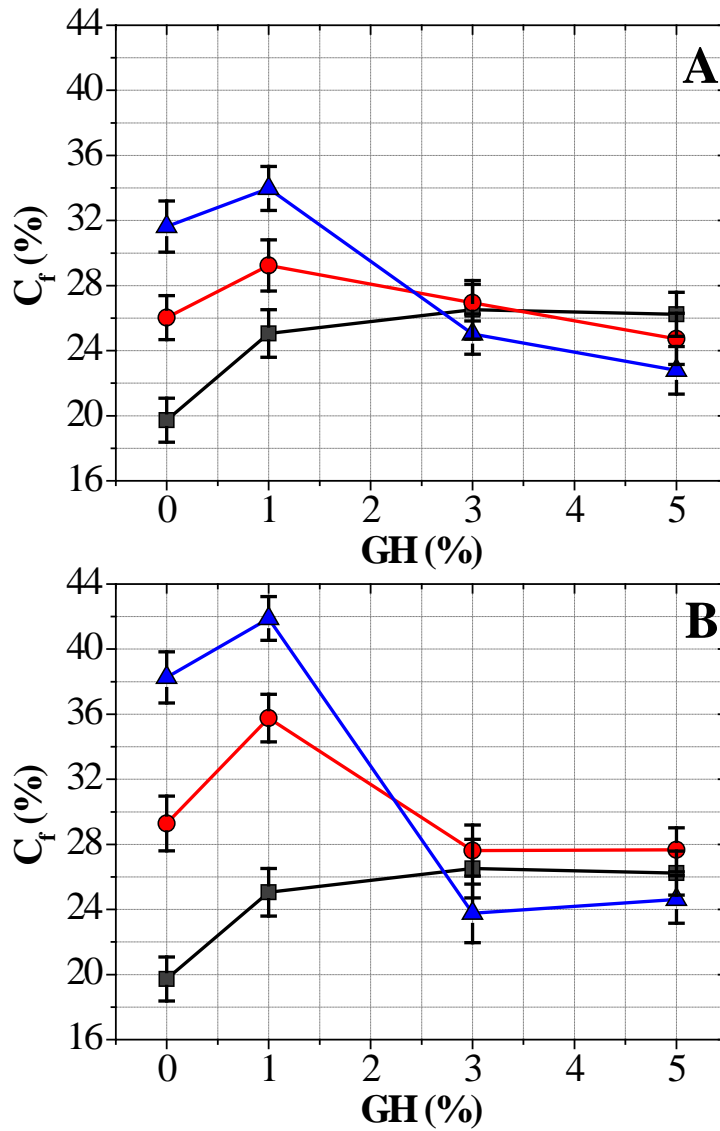


Figura 5.53. Efecto de la concentración de AS (A) y λ -C (B), en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p, sobre la conductividad relativa de espumas (C_f , %) como una función del GH del WPI. Símbolos sistemas Prot:PS: (■) 1,0:0,0 %p/p, (●) 1,0:0,1 %p/p, (▲) 1,0:0,5 %p/p. Temperatura 20 °C, pH 7, and I 0,05M.

Como se mencionó en la Sección 4.3.2, la magnitud de C_f podría interpretarse como una medida de la densidad y de la capacidad de retención de líquido de las espumas. Los valores de C_f estuvieron afectados por la presencia de los PS y por el GH del WPI, siguiendo prácticamente una misma tendencia que los valores de OFC discutidos anteriormente. Particularmente, se observó que:

(i) A bajos GH (0,0-1,0 %), el aumento de la concentración de PS provocó un incremento en los valores de C_f encontrando un valor máximo en los sistemas H1/PS. En estas condiciones, la formación de burbujas más pequeñas y más densas, como así también, la incorporación de líquido en las espumas, estarían favorecidas con el incremento de la concentración de PS en la subfase acuosa de los sistemas mixtos, por un pequeño GH y/o por la acción combinada de ambos factores.

(ii) A mayores GH (3,0-5,0 %), los valores de C_f de los sistemas H2/PS y H3/PS fueron prácticamente similares a los valores de C_f de los hidrolizados puros, indicando que la adición de los PS no tendría efecto sobre el tamaño y densidad de burbujas y sobre la incorporación de líquido de estas espumas.

Relación entre la formación de espumas y las características interfaciales a cortos θ

Los resultados encontrados sugerirían que la capacidad espumante de los hidrolizados en presencia de los PS (en el rango de concentración evaluado) podría estar relacionada con el transporte difusivo y con las características viscoelásticas de las películas interfaciales de los sistemas mixtos. Para comprobar estas hipótesis el parámetro OFC fue relacionado con la constante de velocidad aparente (k_{dif}^a) y con la elasticidad dilatacional superficial inicial, E_{di} (a 0,5 s de adsorción interfacial) de las

películas interfaciales (Carrera Sánchez y Rodríguez Patino, 2005; Rodríguez Patino y col., 2007b). Estas relaciones se presentan en la Figura 5.54.

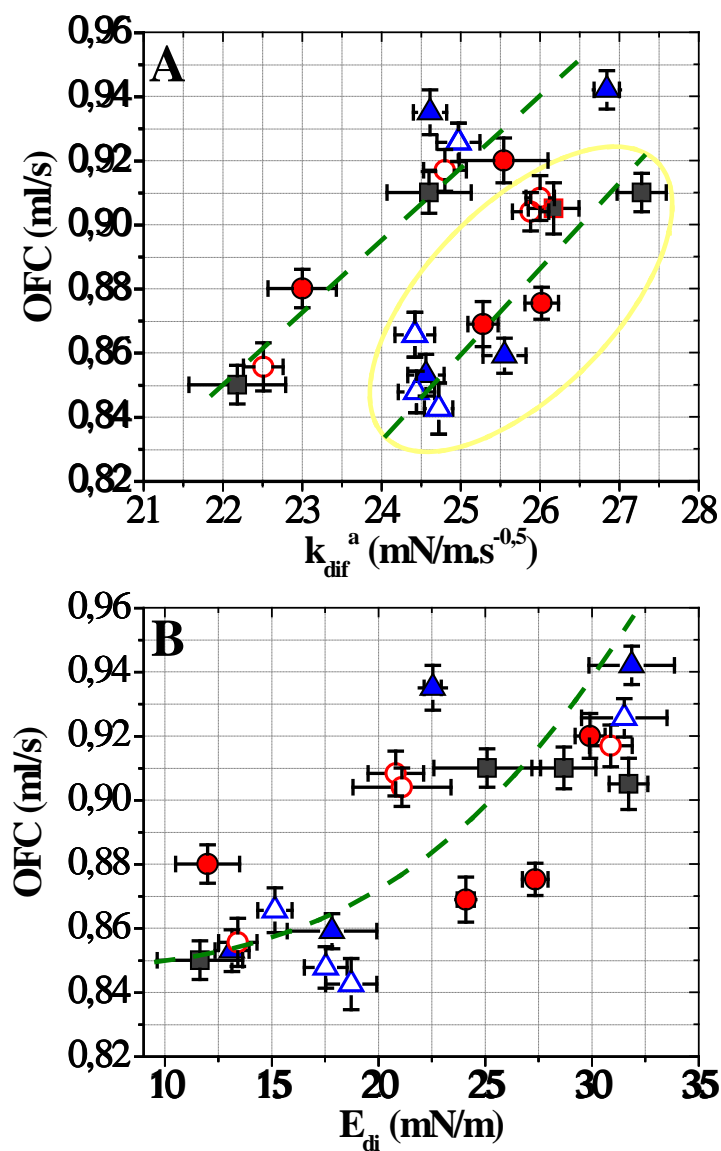


Figura 5.54. Efecto de la velocidad difusión aparente, k_{dif}^a (A) y de la elasticidad dilatacional superficial inicial, E_{di} (B) de las películas interfaciales sobre la capacidad espumante global, OFC (ml/s) de los sistemas Prot:Ps: 1,0:0,0 %p/p (■), 1,0:0,1 %p/p (AS ●, λ-C O), 1,0:0,5 %p/p (AS ▲, λ-C Δ). El área sombreada de amarillo corresponde a los sistemas H2/PS y H3/PS. Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05 M.

La capacidad espumante de los hidrolizados aumentó con la velocidad de difusión hacia la interfase (Figura 5.54A) y con la elasticidad dilatacional inicial de las películas interfaciales (Figura 5.54B). Estos resultados confirman que las características cinéticas e interfaciales (mecánicas) a cortos θ de adsorción son relevantes para la formación de espumas de hidrolizados de WPI en presencia de los PS.

En presencia de PS, las interacciones que promueven una mayor o menor disponibilidad de los hidrolizados para su adsorción interfacial (mayormente determinada por la magnitud de k_{dif}^a y de S_0) podrían provocar un aumento (en los sistemas WPI/PS y H1/PS) o una reducción (en los sistemas H2/PS y H3/PS) de la capacidad espumante, respectivamente, dependiendo de la concentración de PS, de la extensión del tratamiento enzimático limitado y/o del efecto combinado de ambos factores.

5.3.3.2. Efecto de los PS sobre la estabilidad de espumas de hidrolizados de WPI

El efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre el tiempo de vida media ($t_{1/2}$, s) de las espumas como una función del GH (0,0-5,0 %) del WPI, se presenta en la Figura 5.55. Se observó que la magnitud de los valores de $t_{1/2}$ dependió del tipo de PS, de su concentración en solución de los sistemas mixtos y del GH del WPI. En ausencia de PS, se observó que los valores de $t_{1/2}$ aumentaron con el incremento del GH alcanzando un valor máximo a nivel de H2 (GH = 3,0 %). Tal como se ha discutido en la Sección 5.2.3.2, este comportamiento podría vincularse con la modificación estructural del WPI, a nivel de una mayor exposición de *patches* hidrofóbicos y de una mayor flexibilidad de los hidrolizados, como consecuencia de la

hidrólisis enzimática limitada. Sin embargo, se observó que la presencia de PS afectó notablemente la estabilidad de las espumas de hidrolizados (tanto a bajos como a altos GH) dependiendo del tipo de PS y de su concentración relativa en los sistemas mixtos.

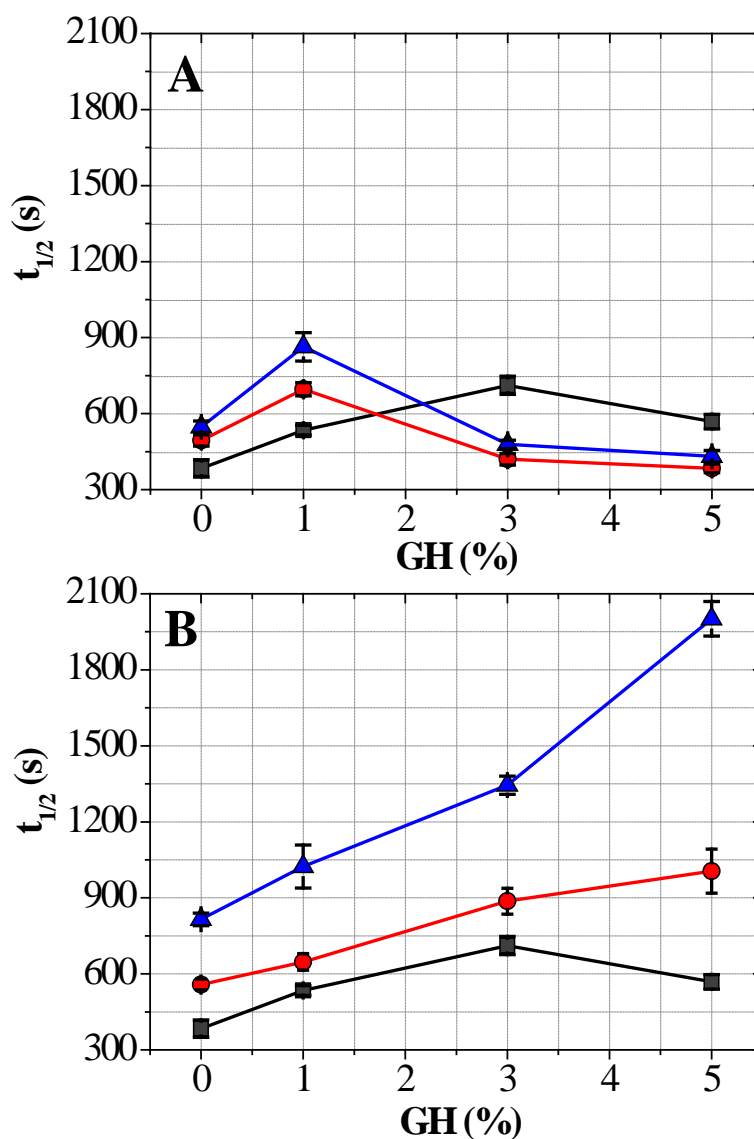


Figura 5.55. Efecto de la concentración de AS (A) y λ -C (B), en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p, sobre el tiempo de vida media de drenaje ($t_{1/2}$, s) o estabilidad estática de las espumas como una función del GH del WPI. Símbolos sistemas Prot:PS: (■) 1,0:0,0 %p/p, (●) 1,0:0,1 %p/p, (▲) 1,0:0,5 %p/p. Temperatura 20 °C, pH 7, and I 0,05M.

La Figura 5.55A presenta el efecto de AS (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre el tiempo de vida media ($t_{1/2}$, s) de las espumas como una función del GH (0,0-5,0 %) del WPI. Se observó que el aumento de la concentración de AS produjo un incremento de la magnitud de $t_{1/2}$ para el WPI y encontró un valor máximo para H1. Sin embargo, el aumento gradual del GH provocó una reducción dramática de los valores de $t_{1/2}$ de las espumas de los sistemas mixtos.

Por otro lado, el efecto de λ -C (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre el tiempo de vida media ($t_{1/2}$, s) de las espumas como una función del GH (0,0-5,0 %) del WPI, se presenta en la Figura 5.55B. Se observó que el aumento gradual de la concentración de λ -C y del GH provocó un incremento en la magnitud de $t_{1/2}$. Además, se observó que la estabilidad de las espumas de los sistemas mixtos con λ -C fue mayor que la de los sistemas mixtos con AS. De manera similar que para el caso de los sistemas WPC/PS (comentados y discutidos en la Sección 5.1.3.2), el aumento de la viscosidad, debido al incremento de la concentración de PS en la fase continua, podría ejercer algún rol sobre la estabilidad de las espumas de hidrolizados de WPI, especialmente para los sistemas mixtos conteniendo λ -C. Sin embargo, la estabilidad global de estas espumas podría interpretarse considerando otros factores (además de la viscosidad de la fase continua) tales como las características reológicas interfaciales de las películas de los sistemas mixtos (a largos θ). Estas características, a su vez, podrían estar estrechamente vinculadas con las interacciones macromoleculares, tanto en la subfase acuosa continua como en el entorno de la interfase aire-agua, tal como se ha discutido en varias secciones de la presente Tesis Doctoral. Así, la naturaleza de las

interacciones entre biopolímeros podría tener una gran repercusión sobre la estabilidad de las espumas de estos sistemas mixtos.

Las Figuras 5.56 y 5.57 presentan el efecto de los PS (en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p) sobre la magnitud de los tiempos de relajación correspondientes a los mecanismos de drenaje/regeneración marginal (t_d) y desproporción/colapso de burbujas (t_{dc}) de las espumas como una función del GH (0,0-5,0 %) del WPI. En ausencia de PS, se observó que el valor de t_{dc} de las espumas de WPI aumentó con el incremento del GH alcanzando un valor máximo a nivel GH = 3,0 % (H2) y que el valor de t_d fue de menor magnitud comparado con t_{dc} . Tal como se ha comentado y discutido en la Sección 5.2.3.2, el comportamiento observado, indicaría que la estabilidad estática de las espumas de hidrolizados sería mayormente atribuida a un aumento de la estabilidad frente al mecanismo de desproporción/colapso de burbujas.

Por otro lado, la presencia de PS afectó notablemente los valores de t_d y t_{dc} de las espumas de hidrolizados dependiendo del tipo de PS, de su concentración relativa en solución y del GH del WPI. Se observó que la evolución de los valores de t_d y t_{dc} con el GH presentó, prácticamente, la misma tendencia que la de los valores de $t_{1/2}$. Este hallazgo sugeriría que la estabilidad estática observada en las espumas de los sistemas mixtos (estimada a partir de los valores de $t_{1/2}$) podría deberse tanto a una mayor estabilidad frente al drenaje/regeneración marginal como a la desproporción/colapso de burbujas. La variación en los valores de t_d (estabilidad frente a drenaje/regeneración marginal) podría relacionarse mayormente con el efecto estabilizante de los PS a través de su aporte a la viscosidad de la fase acuosa continua. Sin embargo, en todos los casos se observó que la magnitud de los valores de t_{dc} fue mayor que la de los valores de t_d ,

indicando que la velocidad de drenaje/regeneración marginal fue mayor que la de desproporción/colapso de burbujas.

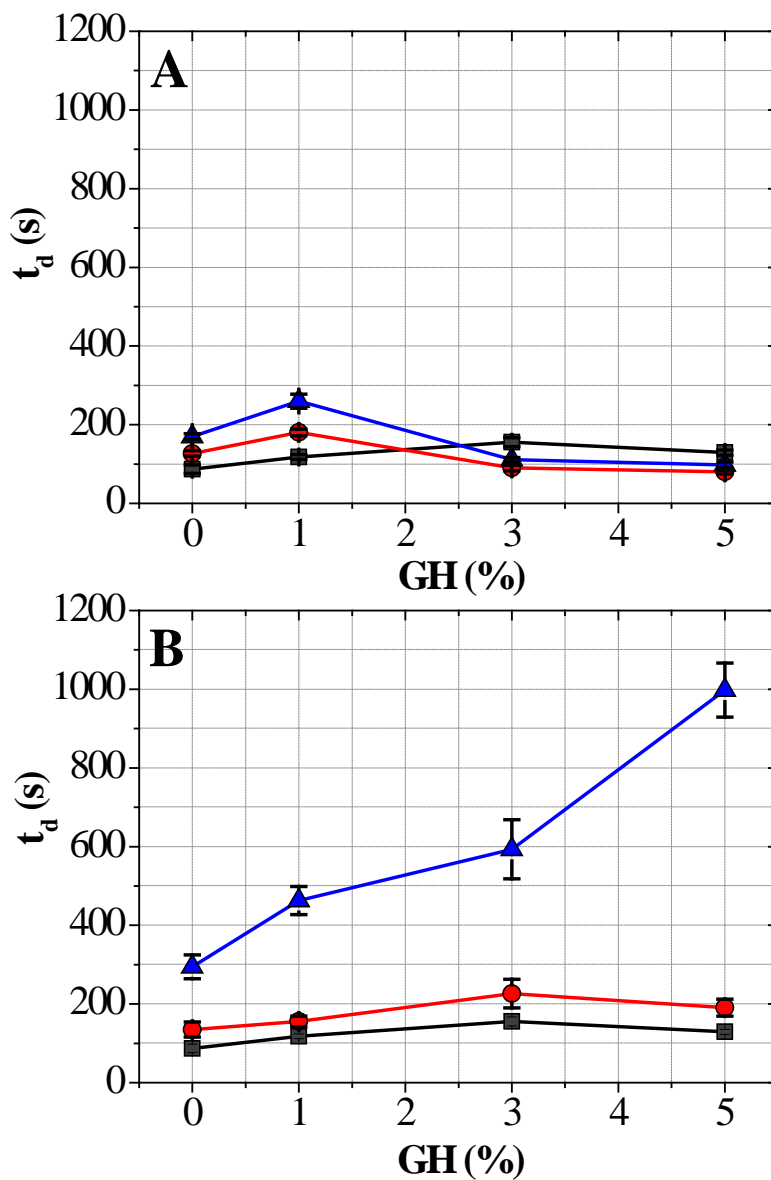


Figura 5.56. Efecto de la concentración de AS (A) y λ -C (B), en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p, sobre el tiempo de relajación correspondiente a la cinética de drenaje gravitacional de líquido y regeneración marginal (t_d , s) de las espumas como una función del GH del WPI. Símbolos sistemas Prot:PS: (■) 1,0:0,0 %p/p, (●) 1,0:0,1 %p/p, (▲) 1,0:0,5 %p/p. Temperatura 20 °C, pH 7, and I 0,05M.

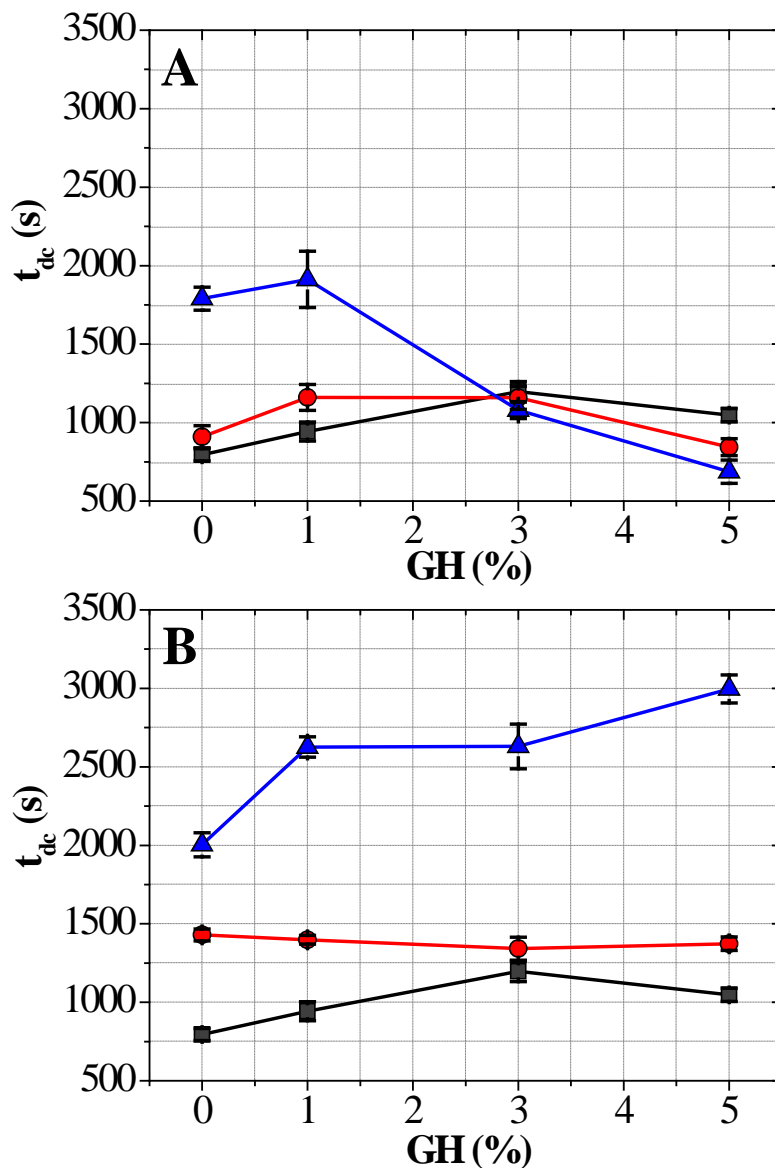


Figura 5.57. Efecto de la concentración de AS (A) y λ -C (B), en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p, sobre el tiempo de relajación correspondiente a la cinética de desproporción de burbujas y colapso (t_{dc} , s) de las espumas como una función del GH del WPI. Símbolos sistemas Prot:PS: (■) 1,0:0,0 %p/p, (●) 1,0:0,1 %p/p, (▲) 1,0:0,5 %p/p. Temperatura 20 °C, pH 7, and I 0,05M.

Relación entre la estabilidad de espumas y las características interfaciales a largos θ

Los resultados encontrados sugerirían que la estabilidad de las espumas de hidrolizados en presencia de los PS (en el rango de concentración evaluado) podría estar vinculada con las características viscoelásticas de las películas interfaciales a largos θ . Para comprobar esta hipótesis el parámetro $t_{1/2}$ fue relacionado con la elasticidad dilatacional superficial final, E_{df} (a 10.800 s de adsorción interfacial) de las películas interfaciales (Carrera Sánchez y Rodríguez Patino, 2005; Rodríguez Patino y col., 2007b). Esta relación se presenta en la Figura 5.58.

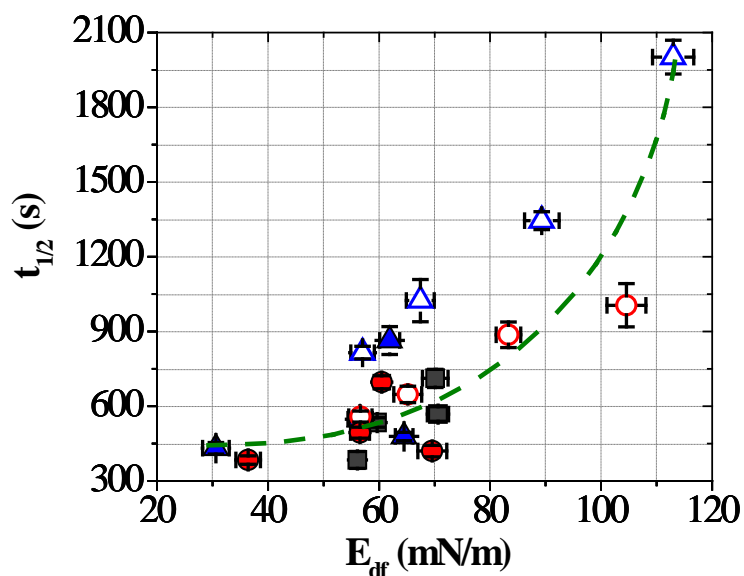


Figura 5.58. Efecto de la elasticidad dilatacional superficial final, E_{df} , de las películas de los sistemas WPC/PS y WPI/PS en el rango de concentración de PS de 0,0-1,0 % p/p, sobre el tiempo de vida media o estabilidad estática, $t_{1/2}$. Símbolos: WPC/AS (■), WPI/AS (□), WPC/ λ -C (●), WPI/ λ -C (○). Concentración de proteína 1,0 % p/p, temperatura 20 °C, pH 7 y I 0,05 M.

Se observó que la estabilidad estática de las espumas de los sistemas mixtos aumentó con la elasticidad dilatacional inicial de las películas interfaciales confirmando que las características interfaciales (mecánicas) a largos θ de adsorción son relevantes para la estabilidad de espumas de hidrolizados de WPI en los sistemas mixtos.

Finalmente, en presencia de PS, las interacciones biopoliméricas que promueven una mayor o menor elasticidad dilatacional de las películas interfaciales (a largos θ), podrían provocar un aumento (sistemas WPI/PS, H1/PS, H2/ λ -C y H3/ λ -C) o una reducción (sistemas H2/AS y H3/AS) de la estabilidad de las espumas de hidrolizados de WPI, respectivamente, dependiendo de la concentración de PS, de la extensión del tratamiento enzimático limitado y/o del efecto combinado de ambos factores.

Capítulo 6

CONCLUSIONES

En primer lugar, la presente Tesis Doctoral abordó el estudio del efecto de la adición de dos polisacáridos aniónicos no superficialmente activos (PS), alginato de sodio (AS) y λ -carragenina (λ -C), en el rango de concentración de 0,0-1,0 %p/p, sobre las propiedades interfaciales y espumantes de un concentrado de proteínas de suero lácteo industrial (WPC), en condiciones de pH neutro y fuerza iónica 0,05 M. Las conclusiones derivadas de este estudio fueron:

❖ La adición de los PS afectó fuertemente la dinámica molecular del WPC en solución acuosa. Aunque la complejidad química del WPC pudo haber hecho más difícil la interpretación de los eventos moleculares en los sistemas WPC/AS y WPC/ λ -C, los estudios complementarios realizados revelaron diferencias significativas en el comportamiento de interacción de ambos tipos de sistemas, dependiendo de la estructura química del PS y de su concentración en la fase acuosa y de las distintas fracciones proteicas (nativa y desnaturalizada o agregada) presentes en la muestra de WPC. Los sistemas WPC/AS se caracterizaron por presentar un comportamiento de segregación y agregación de la proteína en solución debido a la incompatibilidad termodinámica entre el WPC y AS. Por otro lado, los sistemas WPC/ λ -C se caracterizaron por presentar interacciones electrostáticas atractivas que dieron lugar a la formación de complejos WPC- λ -C solubles.

❖ La adición de PS modificó la dinámica de formación de películas de WPC debido a la existencia de interacciones macromoleculares entre los biopolímeros, tanto en la subfase acuosa como en el entorno de la interfase aire-agua. Dichas interacciones tuvieron un fuerte impacto sobre la cinética de adsorción interfacial (velocidad de difusión, penetración y reordenamiento), las características viscoelásticas

de las películas y la estructuración interfacial del WPC, dependiendo de la estructura química del PS, de su concentración en solución y del tiempo de adsorción. En los sistemas WPC/AS, la existencia de fenómenos segregativos debido a la incompatibilidad termodinámica entre los biopolímeros repercutieron de manera compleja sobre la formación y las características viscoelásticas de la película de WPC. A elevada concentración de AS, se observó un deterioro de las propiedades mecánicas interfaciales debido al colapso de la monocapa de WPC adsorbido. Sin embargo, en los sistemas WPC/ λ -C, la formación de complejos electrostáticos WPC- λ -C solubles tuvo un mejor control de las características interfaciales (cinéticas y mecánicas) de la película de WPC favorecido por el aumento de la concentración de λ -C y del tiempo de adsorción.

❖ En ausencia de PS, el WPC presentó una pobre capacidad espumante debido a su elevado contenido de grasa residual (8,0 %p/p). Sin embargo, la adición de PS, mejoró la formación y la estabilidad de sus espumas, alcanzando, en algunos casos, un comportamiento espumante comparable con el WPI. Las propiedades espumantes (formación y estabilidad) de los sistemas WPC/PS se relacionaron con las características interfaciales (cinéticas y reológicas) de las películas. Dichas propiedades pudieron explicarse en términos de la existencia de interacciones macromoleculares sinérgicas (segregación y/o complejación) entre el WPC y los PS, tanto en solución como en el entorno interfacial, cuya naturaleza dependió del tipo de PS y de su concentración en solución. La capacidad espumante y la estabilidad de las espumas de los sistemas mixtos fueron más elevadas para los sistemas WPC/ λ -C respecto de los sistemas WPC/AS. Este hallazgo sugiere que las interacciones que promueven la

formación de complejos solubles podrían ser más efectivas para el mejoramiento de las propiedades interfaciales y espumantes del WPC comparadas con las interacciones que conducen a la segregación y agregación del WPC debido a la incompatibilidad termodinámica entre los biopolímeros.

En segundo lugar, la presente Tesis Doctoral abordó el estudio del efecto de un tratamiento enzimático limitado con α -quimiotripsina II, en el rango de grado de hidrólisis (GH) de 0,0-5,0 %, sobre las propiedades interfaciales y espumantes de un WPI, en condiciones de pH neutro y fuerza iónica 0,05 M. Las conclusiones de este estudio fueron:

❖ La hidrólisis enzimática limitada modificó la estructura del WPI provocando, principalmente, una reducción del tamaño molecular de la proteína y una mayor exposición de sus residuos hidrofóbicos, ocluidos en el interior de la misma, hacia el solvente acuoso.

❖ Las modificaciones estructurales del WPI tuvieron una gran repercusión sobre las propiedades en el equilibrio y dinámicas de la película interfacial. La hidrólisis enzimática limitada provocó un incremento de la actividad superficial, de los parámetros cinéticos de adsorción (velocidad de difusión, penetración y reordenamiento) y de la elasticidad (carácter sólido) de la película de WPI adsorbido sobre la interfase aire-agua.

❖ Un pequeño GH (1,0 %) fue suficiente para aumentar la capacidad espumante del WPI. Sin embargo, la estabilidad de las espumas fue máxima a nivel de un GH de 3,0%. Las propiedades espumantes (formación y estabilidad) de los hidrolizados de WPI se relacionaron con las características interfaciales (cinéticas y reológicas) de las películas. El aumento de la capacidad espumante de los hidrolizados

pudo explicarse en términos de una mayor difusión hacia la interfase y de una mayor elasticidad inicial de las películas interfaciales; mientras que el aumento de la estabilidad de las espumas de los hidrolizados se relacionó con un incremento de la elasticidad de las películas a largos tiempos de adsorción.

Por último, la presente Tesis Doctoral abordó el estudio del efecto de la adición de dos polisacáridos aniónicos no superficialmente activos (PS), alginato de sodio (AS) y λ -carragenina (λ -C), en el rango de concentración de 0,0-0,5 %p/p, sobre las propiedades interfaciales y espumantes de hidrolizados de WPI, en condiciones de pH neutro y fuerza iónica 0,05 M. Las conclusiones derivadas de este estudio fueron:

❖ La adición de los PS afectó fuertemente la dinámica molecular de los hidrolizados de WPI en solución acuosa. Los estudios realizados revelaron diferencias significativas en el comportamiento de interacción de los sistemas mixtos. La fuerza y naturaleza de estas interacciones dependieron del tipo de PS, de su concentración en solución, del GH del WPI y/o de la acción combinada de estos factores. Altas concentraciones de PS promovieron, por un lado, un aumento de la hidrofobicidad superficial de los hidrolizados a bajos GH (0,0-1,0 %) debido a una elevada repulsión electrostática entre los biopolímeros y, por otro lado, una disminución de la hidrofobicidad superficial a elevados GH (3,0-5,0 %) debido a fenómenos segregativos y/o de complejación.

❖ La adición de PS provocó diferentes efectos sobre las propiedades interfaciales y espumantes (formación y estabilidad) de los hidrolizados de WPI en relación con la dinámica de interacción entre los biopolímeros, tanto en la subfase acuosa como en el entorno de la interfase aire-agua. Dichas interacciones tuvieron un fuerte impacto sobre la cinética de adsorción interfacial (velocidad de difusión,

penetración y reordenamiento), las características viscoelásticas de las películas y la estructuración interfacial de los hidrolizados. A bajos GH (0,0-1,0 %), el incremento de la concentración de PS mejoró las características cinéticas, viscoelásticas y espumantes de los hidrolizados debido a la existencia de interacciones macromoleculares sinérgicas entre los biopolímeros. Sin embargo, a elevados GH (3,0-5,0 %), las características cinéticas, viscoelásticas y espumantes de los hidrolizados dependieron, fundamentalmente, del tipo de PS. Así, el aumento de la concentración de AS en la subfase acuosa provocó un deterioro de las características interfaciales (cinéticas y viscoelásticas) debido a interacciones biopoliméricas que promovieron una menor disponibilidad de los hidrolizados para su adsorción interfacial. Sin embargo, el incremento de la concentración de λ -C en la subfase acuosa provocó un mejor control de las características cinéticas y viscoelásticas de las películas de los hidrolizados, principalmente, a largos tiempos de adsorción.

❖ La adición de PS, afectó fuertemente a las propiedades espumantes (formación y estabilidad) de los hidrolizados de WPI dependiendo de la concentración de PS, de la extensión del tratamiento enzimático limitado y/o del efecto combinado de ambos factores. Dichas propiedades se relacionaron con las características interfaciales (cinéticas y reológicas) de las películas interfaciales y con la dinámica de interacción entre los biopolímeros. Así, las interacciones que promueven una mayor o menor disponibilidad de los hidrolizados para su adsorción interfacial podrían provocar un aumento (en los sistemas WPI/PS y H1/PS) o una reducción (en los sistemas H2/PS y H3/PS) de la capacidad espumante, respectivamente. Por otra parte, las interacciones biopoliméricas que promueven una mayor o menor elasticidad de las películas interfaciales (a largos tiempos de adsorción), podrían provocar un aumento (sistemas WPI/PS, H1/PS,

H2/λ-C y H3/λ -C) o una reducción (sistemas H2/AS y H3/AS) de la estabilidad de las espumas de hidrolizados de WPI, respectivamente.

En general, los resultados encontrados en la presente Tesis Doctoral confirmaron las hipótesis planteadas sobre el control de las propiedades espumantes de proteínas de suero lácteo a través del conocimiento de su comportamiento de adsorción interfacial (cinético y reológico) y de las interacciones con otros ingredientes de la matriz alimenticia (tanto en la subfase acuosa como en el entorno de la interfase aire-agua), tales como los polisacáridos.

Los conocimientos básicos y aplicados aportados en esta investigación podrían ser de interés práctico para el desarrollo de nuevos productos a base de proteínas de suero lácteo, para el mejoramiento de los existentes o para la industria alimentaria en general. Además, los avances en el desarrollo de nuevos ingredientes a partir de estas proteínas, ya sea mediante estrategias de formulación (adición de PS), hidrólisis enzimática limitada y/o combinación de ambas, podrían diversificar y aumentar su utilización beneficiando al sector industrial de nuestro país.

NOMENCLATURA

α	Grado de disociación de grupos α -NH ₂
α -LA	Alfa-lactoalbúmina
β -LG	Beta-lactoglobulina
Γ	Concentración superficial
δ_i	Parámetro de solubilidad
ΔDO	Variación de densidad óptica
ΔA	Variación de área interfacial
$\Delta A/A$	Amplitud de deformación dilatacional
ΔE	Variación de energía de vaporización
ΔG_M	Variación de energía libre de mezclado
ΔH_M	Variación de entalpía de mezclado
ΔS_M	Variación de entropía de mezclado
ΔP	Variación de presión
Δw_{ij}	Variación de energía de interacción entre dos componentes i y j
ϕ	Angulo de fase
$\phi-\pi$	Relación entre el angulo de fase y la presión superficial

η	Viscosidad de una disolución
η_0	Viscosidad del solvente puro
η_s	Viscosidad superficial de cizalla
θ	Tiempo de adsorción interfacial
ι -C	Iota-carragenina
κ -C	Kappa-carragenina
λ -C	Lambda-carragenina
λ -C-AM	Complejo metacromático entre λ -C y azul de metileno
λ_M	Longitud de onda a nivel del pico de máxima intensidad de fluorescencia del Trp
π	Presión superficial
π_{eq}	Presión superficial de equilibrio
$\pi_{10.800}$	Presión superficial a 10.800 s
σ	Tensión superficial
σ_0	Tensión superficial del solvente puro
σ_{eq}	Tensión superficial de equilibrio
φ	Fracción de volumen de biopolímeros

φ_i	Fracción de volumen del componente i
χ_{ij}	Parámetro de interacción o segundo coeficiente virial entre dos componentes i y j
ω	Frecuencia angular
AM	Azul de metileno
ANS	Acido 1-anilino-8-naftalen sulfónico
AS	Alginato de sodio
AS-AM	Complejo metacromático entre AS y azul de metileno
BSA	Albúmina sérica bovina
C_0	Concentración de proteína en la subfase acuosa
C_f	Conductividad relativa de espumas
CN	Caseínas
D	Coefficiente de difusión
DO	Densidad óptica
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
E	Módulo dilatacional superficial
E- π	Curva característica o máster de una proteína

E_d	Componente elástica de E o elasticidad dilatacional superficial
E_{di}	Elasticidad dilatacional superficial a cortos tiempos de adsorción
E_{df}	Elasticidad dilatacional superficial a largos tiempos de adsorción
E_v	Componente viscosa de E o viscosidad dilatacional superficial
G	Acido α -L-gulurónico
GH	Grado de hidrólisis
GMP	Glicomacropéptido
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
H1	Hidrolizado de WPI al GH = 1,0 %
H1/AS	Sistemas mixtos formados por H1 + AS
H1:0,1AS	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de H1 + 0,1 %p/p de AS
H1:0,5AS	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de H1 + 0,5 %p/p de AS
H1/ λ -C	Sistemas mixtos formados por H1 + λ -C
H1:0,1 λ -C	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de H1 + 0,1 %p/p de λ -C
H1:0,5 λ -C	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de H3 + 0,5 %p/p de λ -C
H1/PS	Sistemas mixtos formados por H1 + PS

H2	Hidrolizado de WPI al GH = 3,0 %
H2/AS	Sistemas mixtos formados por H2 + AS
H2:0,1AS	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de H2 + 0,1 %p/p de AS
H2:0,5AS	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de H2 + 0,5 %p/p de AS
H2/ λ -C	Sistemas mixtos formados por H2 + λ -C
H2:0,1 λ -C	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de H2 + 0,1 %p/p de λ -C
H2:0,5 λ -C	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de H2 + 0,5 %p/p de λ -C
H2/PS	Sistemas mixtos formados por H2 + PS
H3	Hidrolizado de WPI al GH = 5,0 %
H3/AS	Sistemas mixtos formado H3 + AS
H3:0,1AS	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de H3 + 0,1 %p/p de AS
H3:0,5AS	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de H3 + 0,5 %p/p de AS
H3/ λ -C	Sistema mixtos formado H3 + λ -C
H3:0,1 λ -C	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de H3 + 0,1 %p/p de λ -C
H3:0,5 λ -C	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de H3 + 0,5 %p/p de λ -C
H3/PS	Sistemas mixtos formados por H3 + PS

I	Fuerza iónica
IF _{Trp}	Intensidad de Fluorescencia del Trp
Ig	Inmunoglobulinas
k _{dif}	Constante de velocidad de difusión
k _{dif} ^a	Constante de velocidad de difusión aparente
k _P	Constante de velocidad de penetración
k _R	Constante de velocidad de reordenamiento
k _{SV}	Constante de Stern-Volmer
K	Constante de Boltzman ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$)
h _{tot}	Número total de uniones peptídicas
LF	Lactoferrina
M	Acido b-D-manurónico
MFC	Microscopía de fluorescencia confocal
NSI	Índice de solubilidad de nitrógeno
OFC	Capacidad espumante global
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida

pI	Punto isoeléctrico
PS	Polisacáridos
r_i	Número de segmentos de interacción
R	Constante de los gases ($8,3144 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$)
S_0	Hidrofobicidad superficial
SE-HPLC	Exclusión molecular-cromatografía líquida de alta presión
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
SH	Grupo sulfidrilo libre
S-S	Puente disulfuro
T	Temperatura absoluta
UF	Ultrafiltración
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media o estabilidad estática de espumas
t_d	Tiempo de relajación correspondiente a la cinética del mecanismo de drenaje/regeneración marginal
t_{dc}	Tiempo de relajación correspondiente a la cinética del mecanismo de desproporción/colapso
T_d	Temperatura de desnaturalización
u.a.	Unidades arbitrarias

UV/Vis	Ultravioleta/Visible
WPC	Concentrado de proteínas de suero lácteo
WPC/AS	Sistemas mixtos formados por WPC + AS
WPC:0,1AS	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de WPC + 0,1 %p/p de AS
WPC:0,5AS	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de WPC + 0,5 %p/p de AS
WPC:AS	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de WPC + 1,0 %p/p de AS
WPC/ λ -C	Sistemas mixtos formados por WPC + λ -C
WPC:0,1 λ -C	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de WPC + 0,1 %p/p de λ -C
WPC:0,5 λ -C	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de WPC + 0,5 %p/p de λ -C
WPC: λ -C	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de WPC + 01,0%p/p de λ -C
WPC/PS	Sistemas mixtos formados por WPC + PS
WPI	Aislado de proteínas de suero lácteo
WPIAS	Sistemas mixtos formados por WPI + AS
WPI:0,1AS	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de WPI + 0,1 %p/p de AS
WPI:0,5AS	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de WPI + 0,5 %p/p de AS
WPI:AS	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de WPI + 1,0 %p/p de AS

WPI/ λ -C	Sistemas mixtos formados por WPI + λ -C
WPI:0,1 λ -C	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de WPI + 0,1 %p/p de λ -C
WPI:0,5 λ -C	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de WPI + 0,5 %p/p de λ -C
WPI: λ -C	Sistema mixto formado por 1,0 %p/p de WPI + 01,0%p/p de λ -C
WPI/PS	Sistemas mixtos formados por WPI + PS
Z	Número de coordinación

APENDICES

APENDICE I

CALCULO DE LA TENSION SUPERFICIAL DINAMICA POR EL METODO DE GOTA PENDIENTE AXISIMETRICA

La tensión superficial dinámica, $\sigma_{(t)}$, se calculó por medio del análisis del perfil de la gota en función del tiempo de acuerdo al método descrito por Rodríguez Niño y Rodríguez Patino (2002). Del perfil completo de la gota se puede calcular el valor de la tensión superficial en un período de tiempo muy corto y con una gran precisión. Para determinar la tensión interfacial y el ángulo de contacto se emplea la correlación entre las coordenadas de la forma de la gota y la ecuación de Gauss-Laplace (Anastasiadis y col., 1987; Cheng y col., 1990; del Río y Neumann, 1997).

La ecuación de Gauss-Laplace se describe como:

$$\frac{1}{x} \frac{d}{dx} (x \cdot \text{sen } \varphi) = \frac{2}{b} - C \cdot z \quad (\text{Ec. A1.1})$$

donde x y z son las coordenadas cartesianas en una posición dada del perfil de la gota, b es el radio de curvatura en el punto más bajo de la gota, φ es el ángulo de la tangente al perfil de la gota y C es una constante de capilaridad, ($C = g \Delta\rho/\sigma$, donde σ es la tensión interfacial, $\Delta\rho$ es la diferencia entre las densidades de las dos fases y g es la aceleración de la gravedad).

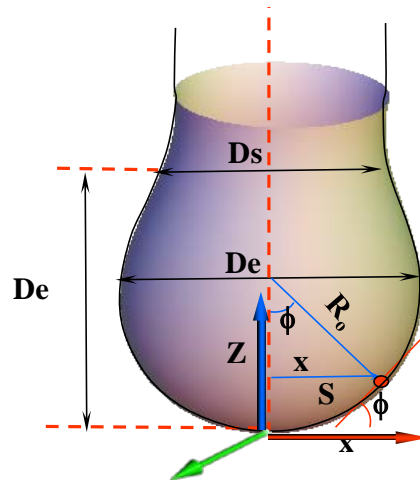


Figura A1.1. Definición de coordenadas y parámetros característicos de una gota pendiente axisimétrica.

Por otro lado, el perfil de una gota axisimétrica puede calcularse en coordenadas adimensionales a partir de las siguientes ecuaciones (Rotenberg y col., 1983; del Río y Neumann, 1997):

$$d\phi/dS = 2 - \beta Y - \text{sen}\phi/X \quad (\text{Ec. A1.2})$$

$$dX/dS = \cos\phi \quad (\text{Ec. A1.3})$$

$$dY/dS = \text{sen}\phi \quad (\text{Ec. A1.4})$$

donde X , Y y S son las coordenadas adimensionales obtenidas al dividir x (coordenada horizontal), y (coordenada vertical), s (longitud del perfil medido por el arco de curvatura y el eje y) por el radio de curvatura, R_0 , respectivamente. El parámetro $\beta = \Delta\rho g R_0^2 / \sigma$, contiene la diferencia de densidades de las fases ($\Delta\rho$), σ es la tensión

superficial del líquido y g es una constante. La definición de todas las coordenadas y de los parámetros característicos de una gota axisimétrica se presenta en la Figura A1.1.

La tensión superficial (σ) se puede calcular teniendo en cuenta las dimensiones características de la gota, D_E y D_S a partir de la siguiente relación (Girault y col., 1984):

$$\Delta\rho g R_0^2 / \sigma = 0.02664 + 0.62945[(D_S / D_E)^2] \quad (\text{Ec. A1.5})$$

Una relación mejorada para el cálculo de σ fue propuesta por Hansen y Rosdrud (1991):

$$\Delta\rho g R_0^2 / \sigma = 0.12836 - 0.7577(D_S / D_E) + 1.7713(D_S / D_E)^2 - 0.5426(D_S / D_E)^3 \quad (\text{Ec. A1.6})$$

Para valores de β comprendidos entre los valores 0.1 y 0.5 se propone el uso del siguiente polinomio para el cálculo de R_0 (Hansen y Rodsur, 1991):

$$D_E / 2R_0 = 0.9987 + 0.1971\beta - 0.0734\beta^2 + 0.34708\beta^3 \quad (\text{Ec. A1.7})$$

Con este sistema de ecuaciones (Ecuaciones A1.2-4) puede calcularse la tensión superficial directamente a partir de las dimensiones características de la gota, D_E y D_S . El dispositivo experimental cuenta con un programa informático que puede realizar

automáticamente la detección de la gota, el cálculo de sus coordenadas y el ajuste de las mismas a la ecuación de Gauss-Laplace.

APENDICE II

COMPORTAMIENTO REOLOGICO DILATACIONAL SUPERFICIAL DE LOS SISTEMAS ESTUDIADOS

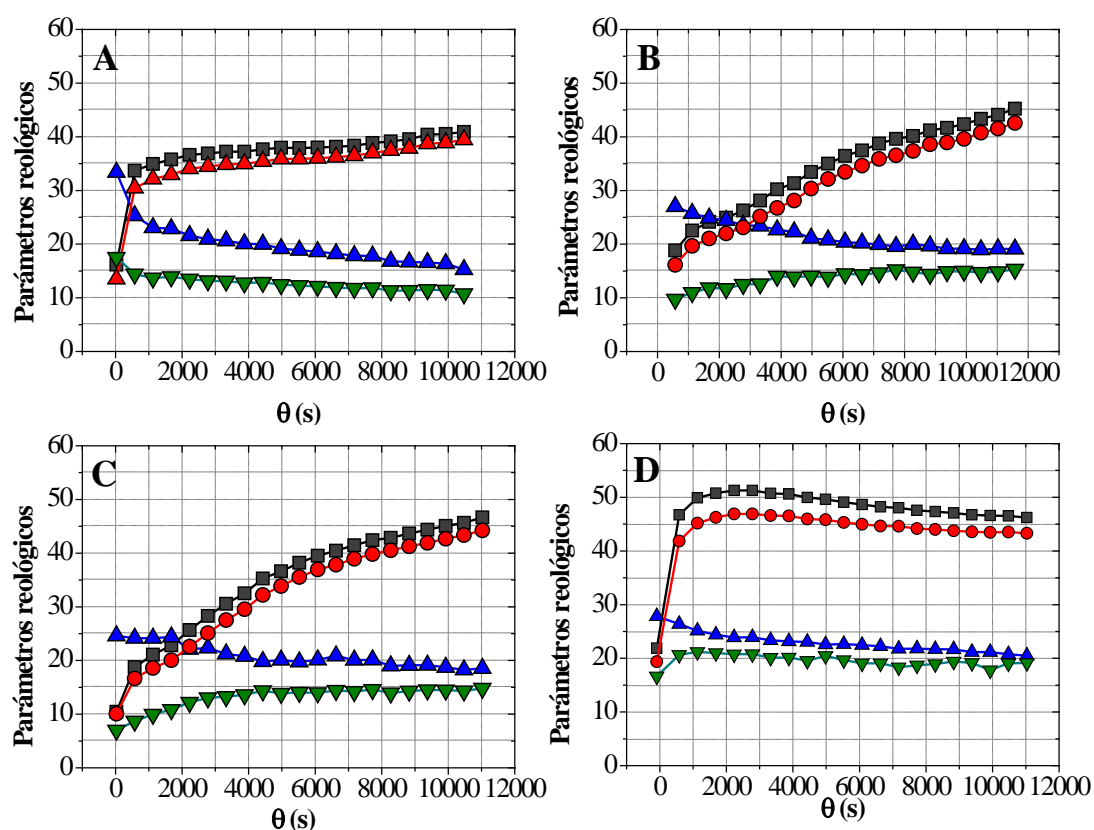


Figura A2.1. Efecto de la concentración de AS (en el rango de 0,0-1,0 %p/p) sobre la evolución temporal de los parámetros reológicos: módulo dilatacional superficial, E (■), componente elástica de E o elasticidad dilatacional superficial, E_d (●), componente viscosa de E o viscosidad dilatacional superficial, E_v (▼) y ángulo de fase, ϕ (▲) de las películas de WPC adsorbido sobre la interfase aire-agua. Concentración de AS: 0,0 %p/p (A), 0,1 %p/p (B), 0,5 %p/p (C) y 1,0 %p/p (D). Concentración de WPC 1,0 %p/p. Amplitud de deformación ($\Delta A/A$) 10 %, Frecuencia angular (ω) 100 mHz, Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05M.

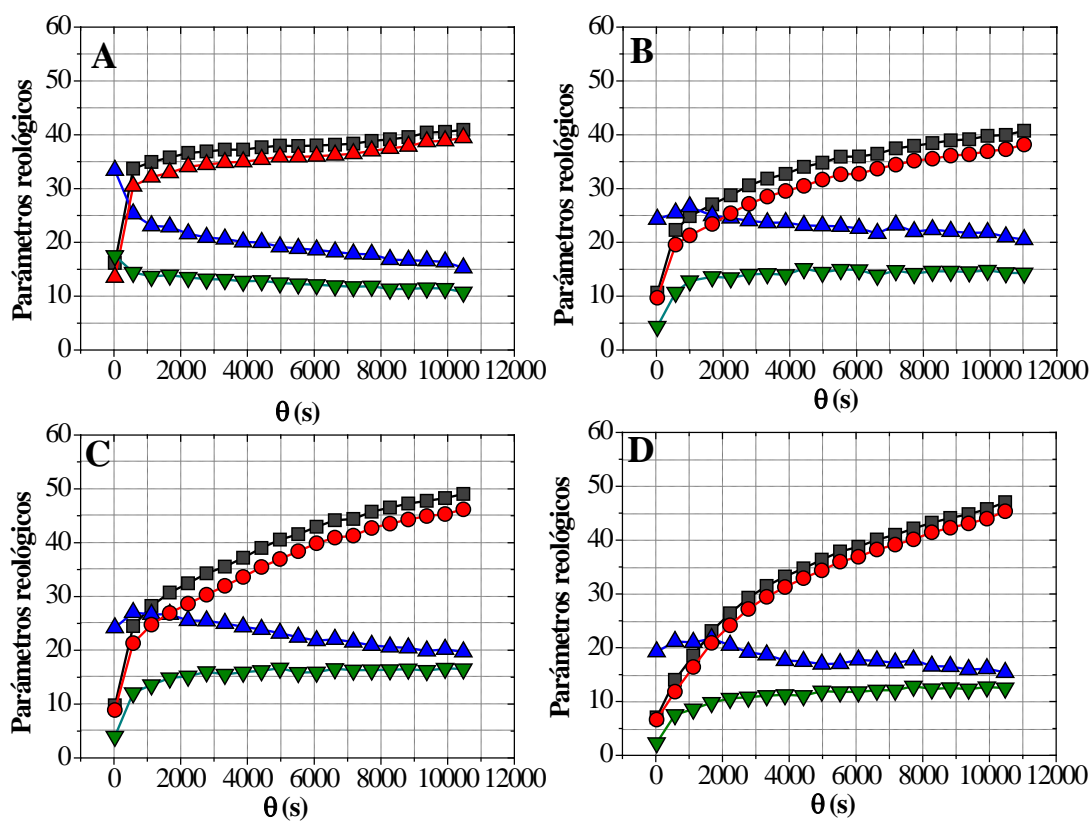


Figura A2.2. Efecto de la concentración de λ -C (en el rango de 0,0-1,0 %p/p) sobre la evolución temporal de los parámetros reológicos: módulo dilatacional superficial, E (■), componente elástica de E o elasticidad dilatacional superficial, E_d (●), componente viscosa de E o viscosidad dilatacional superficial, E_v (▼) y ángulo de fase, ϕ (▲) de las películas de WPC adsorbido sobre la interfase aire-agua. Concentración de λ -C: 0,0 %p/p (A), 0,1 %p/p (B), 0,5 %p/p (C) y 1,0 %p/p (D). Concentración de WPC 1,0 %p/p. Amplitud de deformación ($\Delta A/A$) 10 %, Frecuencia angular (ω) 100 mHz, Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05M.

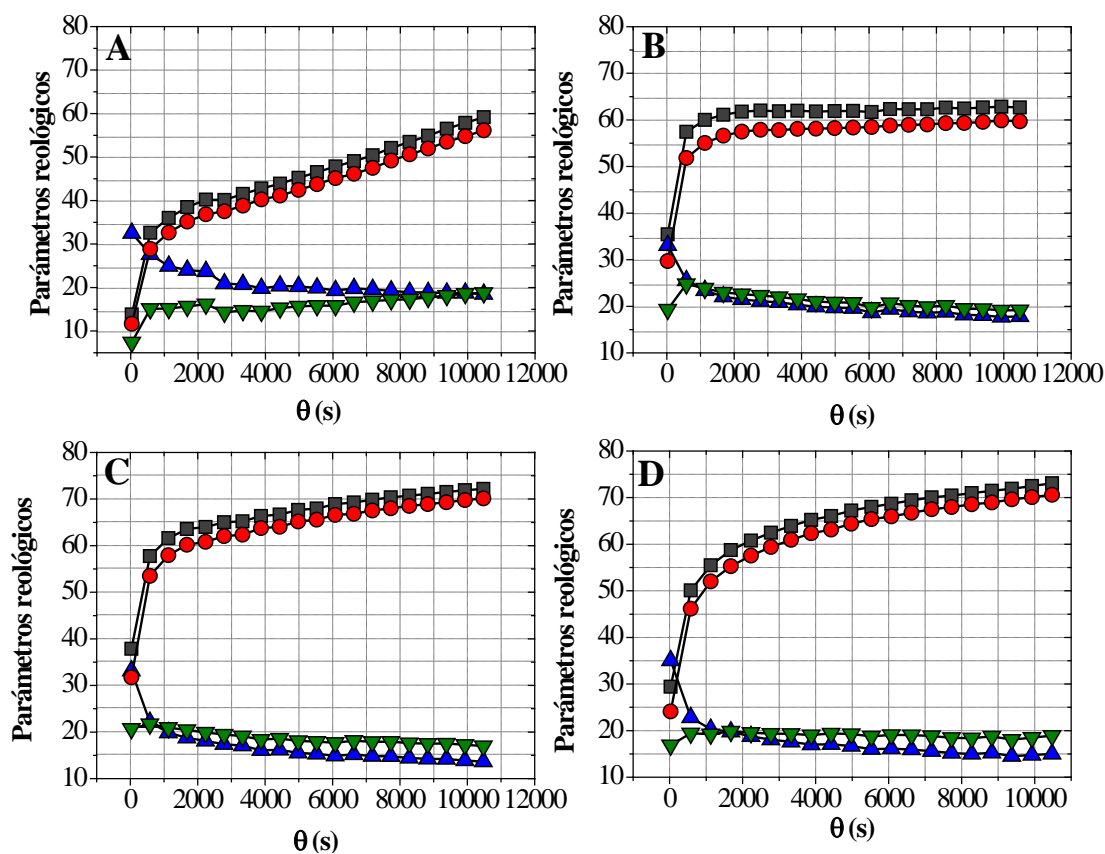


Figura A2.3. Efecto del GH (en el rango de 0,0-5,0 %) sobre la evolución temporal de los parámetros reológicos: módulo dilatacional superficial, E (\blacksquare), componente elástica de E o elasticidad dilatacional superficial, E_d (\bullet), componente viscosa de E o viscosidad dilatacional superficial, E_v (\blacktriangledown) y ángulo de fase, ϕ (\blacktriangle) de las películas de WPI adsorbido sobre la interfase aire-agua. GH: 0,0 % (A), 1,0 % (B), 3,0 % (C) y 5,0 % (D). Concentración de proteína 1,0 %p/p. Amplitud de deformación ($\Delta A/A$) 10 %, Frecuencia angular (ω) 100 mHz, Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05M.

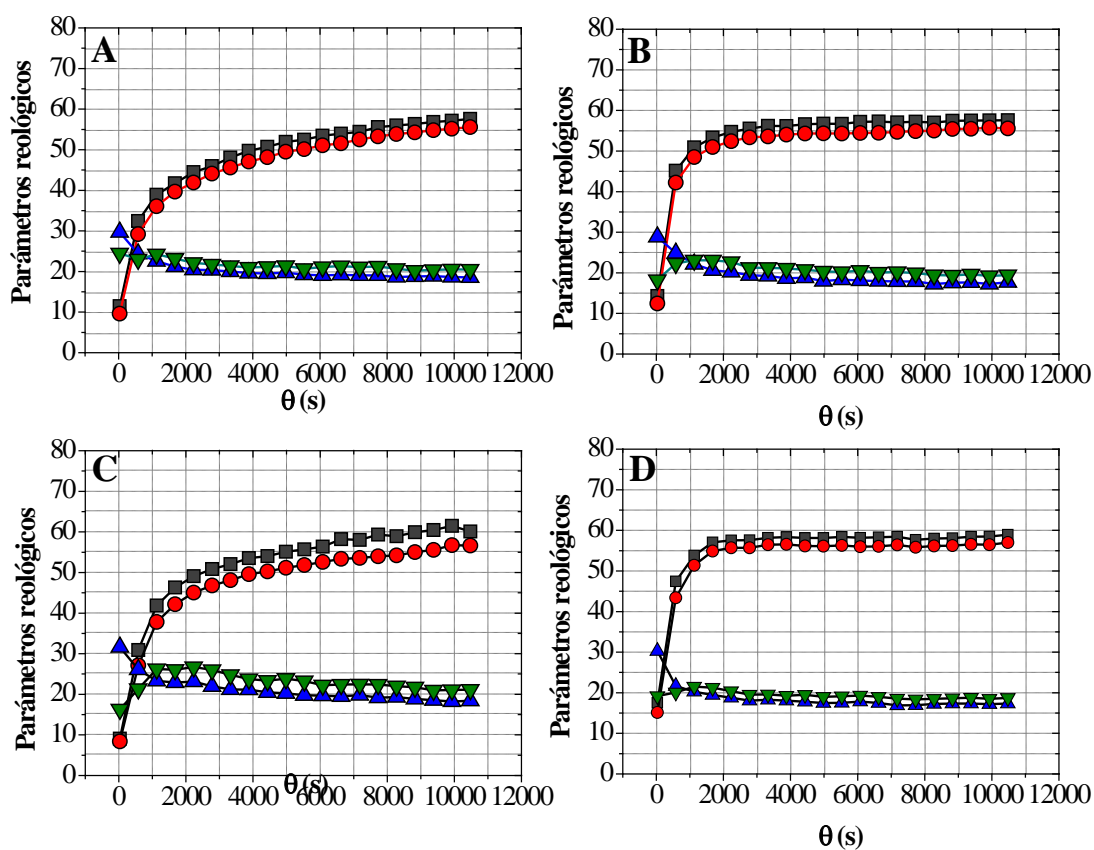


Figura A2.4. Efecto de la concentración de PS (en el rango de 0,0-0,5 %p/p) sobre la evolución temporal de los parámetros reológicos: módulo dilatacional superficial, E (■), componente elástica de E o elasticidad dilatacional superficial, E_d (●), componente viscosa de E o viscosidad dilatacional superficial, E_v (▼) y ángulo de fase, ϕ (▲) de las películas de WPI adsorbido sobre la interfase aire-agua. Sistemas mixtos WPI:AS: 1,0:0,1 %p/p (A), 1,0:0,5 % (B). Sistemas mixtos WPI: λ -C: 1,0:0,1 %p/p (C), 1,0:0,5 % (D). Amplitud de deformación ($\Delta A/A$) 10 %, Frecuencia angular (ω) 100 mHz, Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05M.

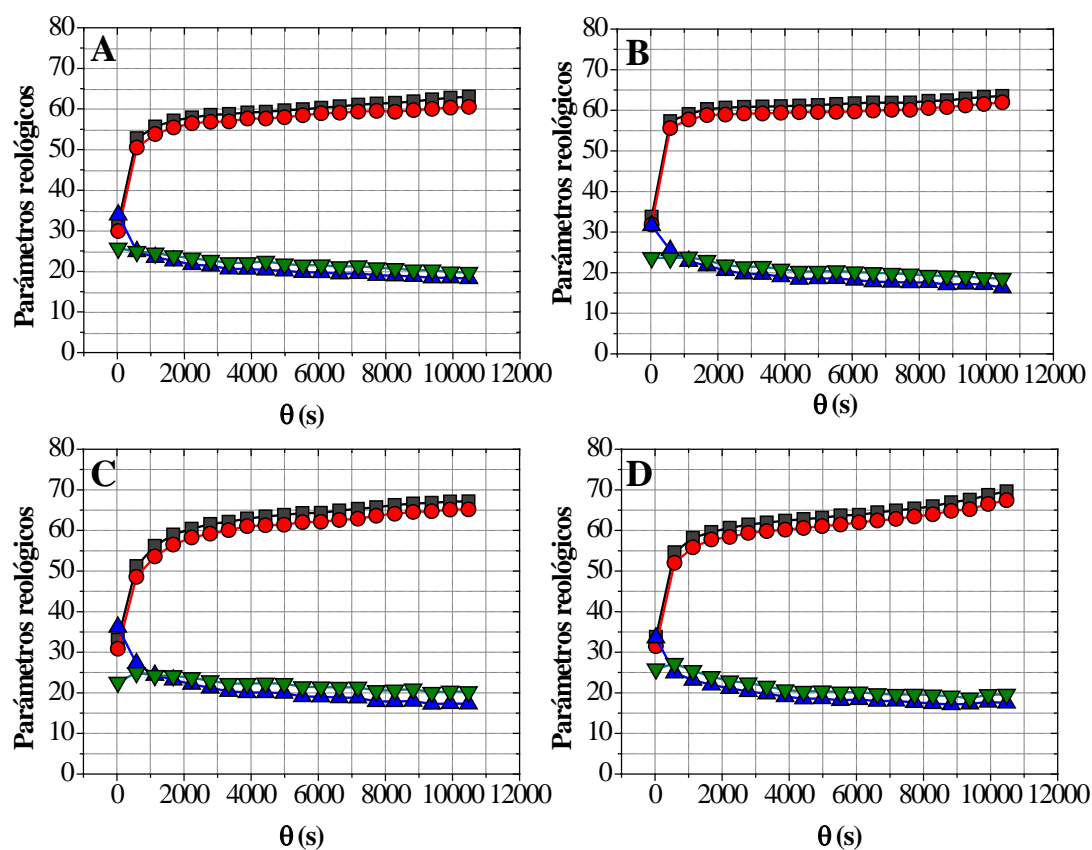


Figura A2.5. Efecto de la concentración de PS (en el rango de 0,0-0,5 %p/p) sobre la evolución temporal de los parámetros reológicos: módulo dilatacional superficial, E (■), componente elástica de E o elasticidad dilatacional superficial, E_d (●), componente viscosa de E o viscosidad dilatacional superficial, E_v (▼) y ángulo de fase, ϕ (▲) de las películas de H1 (GH = 1,0 %) adsorbido sobre la interfase aire-agua. Sistemas mixtos H1:AS: 1,0:0,1 %p/p (A), 1,0:0,5 % (B). Sistemas mixtos H1: λ -C: 1,0:0,1 %p/p (C), 1,0:0,5 % (D). Amplitud de deformación ($\Delta A/A$) 10 %, Frecuencia angular (ω) 100 mHz, Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05M.

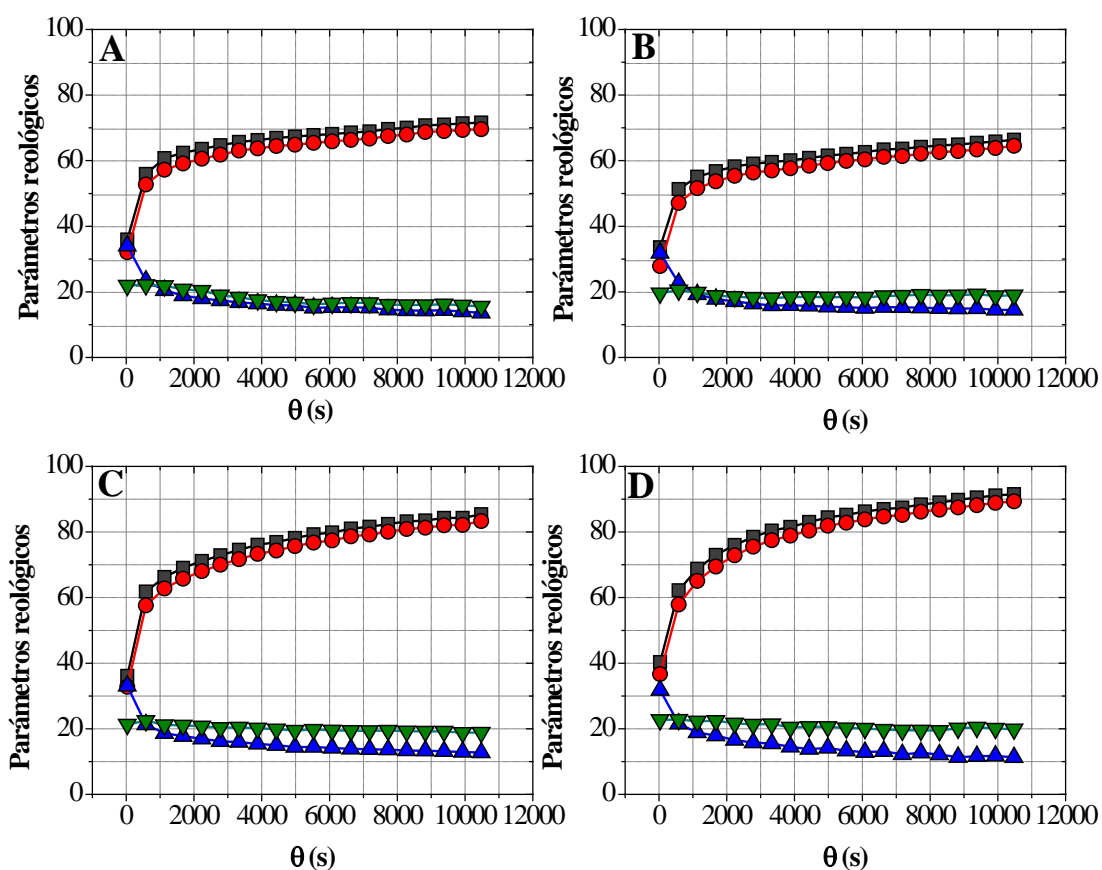


Figura A2.6. Efecto de la concentración de PS (en el rango de 0,0-0,5 %p/p) sobre la evolución temporal de los parámetros reológicos: módulo dilatacional superficial, E (■), componente elástica de E o elasticidad dilatacional superficial, E_d (●), componente viscosa de E o viscosidad dilatacional superficial, E_v (▼) y ángulo de fase, ϕ (▲) de las películas de H2 (GH = 3,0 %) adsorbido sobre la interfase aire-agua. Sistemas mixtos H2:AS: 1,0:0,1 %p/p (A), 1,0:0,5 % (B). Sistemas mixtos H2:λ-C: 1,0:0,1 %p/p (C), 1,0:0,5 % (D). Amplitud de deformación ($\Delta A/A$) 10 %, Frecuencia angular (ω) 100 mHz, Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05M.

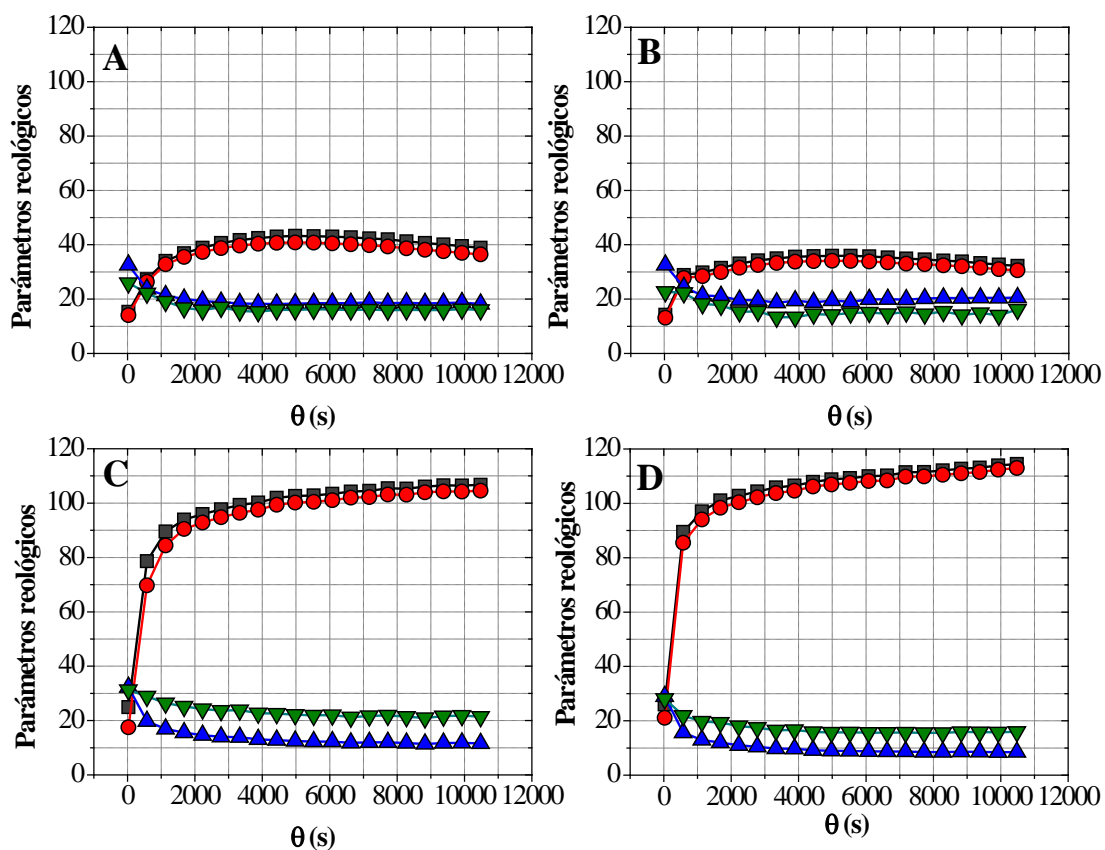


Figura A2.7. Efecto de la concentración de PS (en el rango de 0,0-0,5 %p/p) sobre la evolución temporal de los parámetros reológicos: módulo dilatacional superficial, E (■), componente elástica de E o elasticidad dilatacional superficial, E_d (●), componente viscosa de E o viscosidad dilatacional superficial, E_v (▼) y ángulo de fase, ϕ (▲) de las películas de H3 (GH = 3,0 %) adsorbido sobre la interfase aire-agua. Sistemas mixtos H3:AS: 1,0:0,1 %p/p (A), 1,0:0,5 % (B). Sistemas mixtos H3:λ-C: 1,0:0,1 %p/p (C), 1,0:0,5 % (D). Amplitud de deformación ($\Delta A/A$) 10 %, Frecuencia angular (ω) 100 mHz, Temperatura 20 °C, pH 7, y I 0,05M.

BIBLIOGRAFIA

- AACC (1983). Methods of American Association of Cereal Chemists, Methods 46-23. City, AACC.
- Adler-Nissen, J. (1986). Enzymatic hydrolysis of food proteins. *Elsevier Applied Science Publishers, London and New York*.
- Aksenenko, E.V., Kovalchuk, V.I., Fainerman, V.B., Miller, R. (2006). Surface dilatational rheology of mixed adsorption layers at liquid interfaces. *Advances in Colloid & Interface Science*, 122, 57-56.
- Albani, J.R. (2004). Structure and Dynamics of Macromolecules: Absorption and Fluorescence Studies. *Elsevier, Paris*.
- Alber, T. (1989). Stabilization energies of protein conformation. *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation, Fasman, G.D., Ed., Plenum Press, New York*, p. 161.
- Álvarez Gómez, J.M., Rodríguez Patino, J.M. (2006). Formulation engineering of food model foam containing diglycerol esters and β -lactoglobulin. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 45, 7510-7519.
- Alves, M., Antonov, Y., Gonçalves, M. (1999). The effect of structural features of gelatin on its thermodynamic compatibility with locust bean gum in aqueous media. *Food Hydrocolloids*, 13, 157-166.
- Anastasiadis, S. H., Chen, J. K., Koberstein, J.T., Siegel, A.F., Sohn, J.E., Emerson, J.A. (1987). The determination of interfacial tension by video image processing of pendant fluid drops. *Journal of Colloid and Interface Science*, 119, 1, 55-66.
- Baeza, R., Carrera, C., Pilosof, A.M.R., Rodríguez Patino, J.M. (2005). Interactions of polysaccharides with β -lactoglobulin adsorbed films at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 19, 239-248.

- Baeza, R.I., Pilosof, A.M.R., Carrera, C. Rodríguez Patino, J.M. (2006). Adsorption and rheological properties of biopolymers at the air-water interface. *AIChE Journal*, 52, 7, 2627-2638.
- BeMiller, J.N., Whistler, R.L. (1996). Carbohydrates, in Food Chemistry, 3rd ed., Fennema, O.R., Ed., Marcel Dekker, New York, p. 157.
- Benichou, A., Aserin, A., Lutz, R., Garti, N. (2007). Formation and characterization of amphiphilic conjugates of whey protein isolate (WPI)/xanthan to improve surface activity. *Food Hydrocolloids*, 21, 3, 379-391.
- Bernardi, L.S., Pilosof, A.M.R., Bartholomai, G.B. (1991). Enzymatic modification of soy protein concentrates by fungal and bacterial proteases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68, 102-105.
- Bewley, M.C., Qin, B.Y., Jameson, G.B., Sawyer, L., Baker E.N. (1997). β -Lactoglobulin and its variants: A three-dimensional structural perspective. in *Milk Protein Polymorphism. Int. Dairy Fed. Special Issue 9702. Int. Dairy Fed., Brussels*, p. 100-109.
- Blecker, C., Paquot, M., Lamberti, I., Sensidone, A., Lognay, G., Deroanne, C. (1997). Improved emulsifying and foaming of whey proteins after enzymatic fat hydrolysis. *Journal of Food Science*, 61, 48-52.
- Bombara, N., Añón, M.C., Pilosof, A.M.R. (1997). Functional properties of protease modified wheat flours. *Lebensmittel Wissenschaftund-Technologie*, 30, 441-447.
- Bos, M.A., van Vliet, T. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Advances in Colloid & Interface Science*, 91, 3, 437-471.
- Bourriot, S., Garnier, C., Doublier, J. L. (1999). Phase separation, rheology and microstructure of micellar casein-guar gum mixtures. *Food Hydrocolloids*, 13, 1, 43-49.
- Brash, J.L. Horbett, T.A. (1987). Proteins at Interfaces. *American Chemical Society, Washington, D.C.*

- Brew, K., Castellino, F.J., Vanaman, T.C., Hill, R.L. (1970). The complete amino acid sequence of bovine α -lactalbumin. *Journal of Biological Chemistry*, 245, 4570-4582.
- Brew, K., Hill, R.L. (1975). Lactose biosynthesis. *Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology*, 72, 105-158.
- Brittan, H., Mudford, J.C., Norris, G.E., Kitson, T.M., Hill, J.P. (1997). Labeling the free sulfhydryl group in β -lactoglobulin A, B and C. *In Milk Protein Polymorphism, Int. Dairy Fed. Special Issue 9702, Int. Dairy Fed., Brussels*, p. 200-203.
- Brownlow, S., Morais Cabral, J.H., Cooper, R., Flower, D.R., Yewdall, S.J., Polikarpov, I., North, A.C.T., Sawyer, L. (1997). Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution: Still an enigmatic lipocalin. *Structure*, 5, 481-495.
- Brown, J. R. (1975). Structure of bovine serum albumin. *Fed. Proc. Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34, 591.
- Burr, R., Moore, C.H., Hill, J.P. (1996). Evidence of multiple glycosylation of bovine β -lactoglobulin by electro-spray ionization mass spectrometry. *Milchwissenschaft*, 51, 488-492.
- Bryant, C.R., Cory, M., McClements, D.J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Food Science and Technology*, 9, 143-151.
- Caessens, P.W.J.R., Daamen, W.F., Gruppen, H., Visser, S., Voragen, A.G.J. (1999). β -Lactoglobulin Hydrolysis. 2. Peptide Identification, SH/SS Exchange, and Functional Properties of Hydrolysate Fractions Formed by the Action of Plasmin. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 47, 8, 2980-2990.
- Carrera, C., Rodríguez Niño, M.R., Lucero, A., Rodríguez Patino, J.M. (2005). Biopolymers and emulsifiers at the air-water interface. Implications in food colloid formulation. *Journal of Food Engineering*, 67, 225-234.

- Carrera, C., Rodríguez Patino, J.M. (2005). Interfacial, foaming and emulsifying characteristics of sodium caseinate by protein concentration in solution. *Food Hydrocolloids*, 19, 407-416.
- Carter, D.C., Ho. J.X. (1994). Structure of serum albumin. *Advances in Protein Chemistry*, 45, 153-203.
- Cayot, P., Lorient, D. (1997). Structure-function relationships of whey proteins. In S. Damodaran, & A. Paraf (Eds.), *Food proteins and their applications*, Marcel Dekker, New York, p. 225-256.
- Cesero, A. (1994). The role of conformation on the thermodynamics and rheology of aqueous solutions of carbohydrate polymers. In *Water in Foods: Fundamental Aspects and Their Significance in Relation to the Processing of Foods*, Fito, P., Mullet, A., and McKenna, B., Eds., Elsevier Applied Science, London, p. 27.
- Cheftel, J.C., Cuq, J.L., Lorient, D. (1989). Proteínas Alimentarias. Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- Cheng, P., Li, D., Boruvka, L., Rotenberg, Y., Neumann A.W. (1990). Automation of axisymmetric drop shape analysis for measurements of interfacial tensions and contact angles. *Colloids and Surfaces*, 43, 2, 151-167.
- Cho, Y., Batt, C.A., Sawyer, L. (1994). Probing the retinol-binding site of bovine β -lactoglobulin. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 11102-11107.
- Chobert, J.M., Bertrand Harb, J., Nicolas, M.G. (1988). Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1088, 36, 883-892.
- Cornec, M., Narsimhan, G. (1998). Effect of contaminant on adsorption of whey proteins at the air-water interface. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 46, 2490-2498.
- Croguennec, T., Renault, A., Bouhallab, S., Pezennec, S. (2006). Interfacial and foaming properties of sulfhydryl-modified bovine β -lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 302, 1, 32-39.

- Dalgleish, D.G. (1996). Food emulsions. In: J. Sjoblom, *Emulsions and emulsion stability*, Marcel Dekker, New York, p. 287-321.
- Damodaran, S. (1990). Interfaces, protein films and foams. In *Advances in Food and Nutrition Research*, Vol. 34, Kinsella, J.E., Ed., Academic Press, San Diego. p. 1.
- Damodaran, N.S. (1996). Amino acids, peptides and proteins. In *Food Chemistry*, 3rd ed., Fennema, O.R., Ed., Marcel Dekker, New York, p. 321.
- Damodaran, S., Paraf, A. (1997). Food proteins and their applications. *Marcel Dekker Inc. New York*, p. 681.
- Damodaran, S., Song, K.B. (1988). Kinetics of adsorption of protein at interfaces: role of protein conformation in diffusional adsorption. *Biochimica et Biophysica Acta*, 954, 253-264.
- Damodaran, S. (2004). Adsorbed layers formed from mixtures of proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9, 328-339.
- Davis, J.P., Doucet, D., Foegeding, E.A. (2005). Foaming and interfacial properties of hydrolyzed β -lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 288, 412-422.
- Dea, I.C.M. (1982). Polysaccharide conformation in solutions and gels. In *Food Carbohydrates*, Lineback, D.R. and Inglett, G.E., Eds., AVI Publishing, Westport, CT, cap. 22.
- De Feijter, J.A., Benjamins, J. (1987). Adsorption kinetics of proteins at the air-water interface. In E. Dickinson (Ed.), *Food emulsions and foams*, Royal Society of Chemistry, London, p.72-85.
- De la Fuente, M.A., Singh H., Hemar, Y. (2002). Recent advances in the characterization of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 262-274.
- De Wit, J.N. (1981). Structure and functional behaviour of whey proteins. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 35, 47-64.

- De Wit, J.N., Klarenbeek, G., Adamse, M. (1986). Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 2. Effects of processing history and composition. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 40, 41-56.
- De Wit, J.N., Hontelez Back, E., Adamse, M. (1988). Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolate. 3. Functional properties in aqueous solution. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 42, 155.
- De Wit, J.N., van Kessel, T. (1996). Effects of ionic strength on the solubility of whey protein products. A colloid chemical approach. *Food Hydrocolloids*, 10, 143.
- Del Río, O.I., Neumann, A.W. (1997). Axisymmetric Drop Shape Analysis: Computational Methods for the Measurement of Interfacial Properties from the Shape and Dimensions of Pendant and Sessile Drops. *Journal of Colloid and Interface Science*, 196, 2, 136-147.
- Dickinson, E. (1992). Introduction to food colloids. *Oxford: Oxford University Press*.
- Dickinson, E. (1994). Colloidal aspects of beverages. *Food Chemistry*, 51, 343-347.
- Dickinson, E. (2001). Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces*, 20, 3, 197-210.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25-39.
- Dickinson E. (2006). Colloid science of mixed ingredients. *Soft Matter*, 2, 8, 642-652.
- Dickinson, E., Ettelaie, R., Kostakis, T., Murray, B.S. (2004). Factors controlling the formation and stability of air bubbles stabilized by partially hydrophobic silica nanoparticles. *Langmuir*, 20, 8517-8525.
- Dickinson, E., Matsumura, Y. (1991). Time-dependent polymerization of β -lactoglobulin through disulphide bonds at the oil–water interface in emulsions. *International Journal of Biology and Macromolecules*, 13, 26.

- Dickinson, E. McClements, D.J. (1995). *Advances in Food Colloids*, Chapman & Hall, London.
- Dickinson, E., Semenova, M.G. (1992). Emulsifying properties of covalent protein-dextran hybrids. *Colloids & Surfaces*, 64, 299-310.
- Dickinson, E., Stainsby, G. (1982). *Colloids in Foods*, Applied Science Publishers, London.
- Dill, K.A. (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, 29, 7133.
- Doublier, J.L., Garnier, C., Renard, D., Sanchez, C. (2000). Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5, 184-196.
- Du, Z., Bilbao Montoya, M.P., Binks, B.P., Dickinson, E., Ettelaie, R. Murray, B.S. (2003). Outstanding stability of particle-stabilized bubbles. *Langmuir*, 19, 3106-3108.
- Dziezak, J.D. (1991). A focus on gums. *Food Technology*, 45, 3, 115.
- Ennis, M.P., Mulvihill, D.M. (2000). Milk proteins. In *Handbook of Hydrocolloids*. Ed G. O. Phillips & P.A. Williams. Woodhead Publishing Eds. CRC Press. Cambridge.
- Ettelaie, R., Akinshina, A., Dickinson, E. (2008). Mixed protein-polysaccharide interfacial layers: a self consistent field calculation study. *Faraday Discussions*, 139, 161-178.
- Everett, D.H. (1988). *Basic principles of colloid science*, Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Exl, B.M. (2001). A review of recent developments in the use of moderately hydrolyzed whey formulae in infant nutrition. *Nutrition Research*, 21, 355-379.
- Farrell, H.M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., Hicks, C.L., Hollar, C.M., Kwai-Hang, K.F., Swaisgood, H.E. (2004). Nomenclature of the proteins of cow's milk. Sixth Revision. *Journal of Dairy Science*, 87, 1641-1674.
- Fennema, O.R. (1996). *Food Chemistry*, 3rd ed., Fennema, O.R., Ed., Marcel Dekker, New York.
- Flory, P.J. (1942). Thermodynamics of high polymer solutions. *Journal of Chemical Physical*, 10, 51-61.

- Foegeding, E.A., Luck, P.J., Davis, J.P. (2006). Factors determining the physical properties of protein foams. *Food Hydrocolloids*, 20, 284-292.
- Fox, P.F. (2003). Milk proteins: general and historical aspects. In P.F. Fox, & P. McSweeney, *Advanced Dairy Chemistry (Vol. 1): Proteins, Part A, 3rd edition, Plenum Pres, New York*,. p. 1-41.
- Franks, F. (1991). Hydration phenomena: An update and implications for the food processing industry. In *Water Relationships in Foods: Advances in the 1980's and Trends for the 1990's*, Levine, H. and Slade, L., Eds., Plenum Press, New York, p. 1.
- Friberg, S. Larsson, K. (1997). Eds., *Food Emulsions, 3rd ed., Marcel Dekker, New York*.
- Friedman, M. (1973). The chemistry and biochemistry of the sulfydryl group in amino acids, peptides and proteins, *Pergamon Press, Oxford*.
- Galazka, V.B., Smith, D., Ledward, D.A., Dickinson, E. (1999). Complexes of bovine serum albumin with sulphated polysaccharides effects of pH, ionic strength and high pressure treatment. *Food Chemistry*, 64, 303-310.
- Ganzevles, R.A., Cohen Stuart, M.A., van Vliet, T., de Jongh, H.H.J. (2006). Use of polysaccharides to control protein adsorption to the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 20, 872-878.
- Girault, H.H.J., Schiffrin, D.J., Smith, B.D.V. (1984). The measurement of interfacial tension of pendant drops using a video image profile digitizer. *Journal of Colloid and Interface Science*, 101, 257-266.
- Glicksman M. (1983). Gum arabic (Gum acacia). In: *Glicksman M. (Ed.), Food Hydrocolloids, v.2. CRC Press, Boca Raton, U.K.*
- Graham, D.E., Phillips, M.C. (1979). Proteins at liquid interfaces. 3. Molecular structures of adsorbed films. *Journal of Colloid and Interface Science*, 70, 427-433.

- Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C., Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Letters*, 32, 195-198.
- Grinberg, V., Tolstoguzov, V. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*, 11, 145-158.
- Guillerme, C., Loisel, W., Bertrand, D., Popineau, Y. (1993). Study of foam stability by video image analysis: relationships with the quality of liquid in the foams. *Journal of Texture Studies*, 24, 287-302.
- Guzey, D., McClements, D.J. (2007). Impact of electrostatic interactions on formation and stability of emulsions containing oil droplets coated by β -lactoglobulin-pectin complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 475-485.
- Halling, P.J. (1981). Protein-stabilized foams and emulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 12, 155-203.
- Hambling S.G., McAlpine, A.S., Sawyer, L. (1992). β -Lactoglobulin. In *Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1. Proteins*. P. F. Fox, ed. Elsevier Applied Science, London, p. 141-190.
- Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., McClements, D.J. (2006). Characterization of β -lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20, 5, 577-585.
- Hansen, F.K., Rodsrud, G. (1991). Surface tension by pendant drop. A fast standard instrument using computer image analysis. *Journal of Colloid & Interface Science*, 141, 1-12.
- Hartel, G.L. y Hasenhuette, R.W. (1997). Food emulsions and their applications. *Eds. Chapman & Hall, New York*.
- Hattori, T., Kimura, K., Seyrek, E., Dubin, P.L. (2001). Binding of bovine serum albumin to heparin determined by turbidimetric titration and frontal analysis continuous capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 295, 2, 158-167

- Hayes, J.F., Dunkerley, J.A., Muller, L.L, Griffin, A.T. (1974). Studies on whey processing by ultrafiltration. II. Improving permeation rates by preventing fouling. *Australian Journal of Dairy Technology*, 29, 132.
- Hemar, Y., Tamhana, M., Munro, P. A., Singh, H. (2001). Viscosity, microstructure and phase behaviour of aqueous mixtures of commercial milk protein products and xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 15, 565-574.
- Hiemenz, P.C. (1986). Principles of colloid and surface chemistry, *Dekker, New York*.
- Hill, J.P., Boland, M.J., Creamer, L.K., Anema, S.G., Otter, D.E., Paterson, G.R., Lowe, R., Motion, R.L., Thresher, W.C. (1996). Effect of bovine β -lactoglobulin phenotype on the properties of β -lactoglobulin, milk composition, and dairy products. *In Macromolecular Interactions in Food Technology. ACS Symp. Ser. 650. N. Parris, A. Kato, L. K. Creamer, and R. J. Pearce, ed. Amer. Chem. Soc., Washington, DC. p. 281-294.*
- Hiraoka, Y., Segawa, T., Kuwajima, K., Sugai, S., Murai, N. (1980). α -Lactalbumin. A calcium metalloprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 95, 1098-1104.
- Hollingsworth, P. (1995). Food research: Cooperation is the key. *Food Technology*, 49, 2, 67-74.
- Holmberg, K. (2002). Speciality surfactans. *In Handbook of applied surfaces and colloid chemistry Vol. I. Holmberg, K., Shah, D. O. and Schwuger, M. J., ed. John Wiley & Sons Ltd, England. p. 385-406.*
- Horne, D.S., Rodríguez Patino, J.M. (2003). Biopolymers at Interfaces, *New York, Marcel Dekker*, p. 857-900.
- Hu, Y.H., Liu, Y., Zhang, L.X., Zhao, R.M., Qu, S.S. (2005). Studies of interaction between colchicine and bovine serum albumin by fluorescence quenching method. *Journal of Molecular Structure*, 750, 174-178.

- Huang, D.M., Chandler, D. (2000). Temperature and length scale dependence of hydrophobic effects and their possible implications for protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 15, 8324-8327.
- Huffman, L.M., Harper, J.M. (1999). Maximizing the value of milk through separation technologies. *Journal of Dairy Science*, 82, 2238-2244.
- Hunter, R. J. (1989). Foundations of colloids science. *Oxford, England: Oxford University Press*. p. 796.
- Hurley, W.L., Ventling, B.L., Ma, M., Larson, B.L. (1990). Variability in physicochemical properties of dried wheys from commercial sources. *Journal of Food Quality*, 13, 119-127.
- Imeson, A. (1990). Applications of alginates. In: G. O. Phillips, O.J. Wedlock, & P.A. Williams, *Gums and Stabilizers for the Food Industry*, IRL Press New York, p. 553-562.
- Ipsen, R., Otte, J., Sharma, R., Nielsen, A., Hansen, L.G., Qvist, K.B. (2001) Effect of limited hydrolysis on the interfacial rheology and foaming properties of β -lactoglobulin A. *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces*, 21, 173-178.
- Israelachvili, J.N. (1992). Intermolecular and Surface Forces, *Academic Press, London*.
- Jakob, E., Puhan, Z. (1992). Technological properties of milk as influenced by genetic polymorphism of milk proteins: A review. *International Dairy Journal*, 2, 157-178.
- Karleskind, D., Laye, I., Mei, F.I., Morr, C.V. (1995). Foaming properties of lipid-reduced and calcium-reduced whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 60, 738-741.
- Kato, A., Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe methods and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 624, 13-20.
- Kato, A., Takanashi, A., Matsudomi, N., Kobayashi, K. (1983). Determination of foaming properties of proteins by conductivity measurements. *Journal of Food Science*, 48, 62-65.

- Kim, S.H., Kinsella, J.E. (1985). Surface activity of food proteins: Relationships between surface pressure development, viscoelasticity of interfacial films and foam stability of bovine serum albumin. *Journal of Food Science*, 50, 1526-1530.
- Kinsella, J.E. (1982). Relationships between structure and functional properties of food proteins. In *Food Proteins*, Fox, P.F. and Condon, J.J., Eds., Applied Science Publishers, London, p. 51.
- Kinsella, J.E., Phillips L.G. (1989). Structure-function relationships in food proteins, films and foaming behavior. In *Food proteins*, ed. by J.E. Kinsella and W.G. Soucie. The AOCS, Champaign, IL, cap. 4, p. 52-77.
- Kuhn, N.J., Carrick, D.T., Wilde, C.J. (1980). Lactose synthesis: Possibilities of regulation. *Journal of Dairy Science*, 63, 328-336.
- Kumar, V., Sharma, V.K., Kalonia, D.S. (2005). Second derivative tryptophan fluorescence spectroscopy as a tool to characterize partially unfolded intermediates of proteins. *International Journal of Pharmaceutics*, 294, 193-199.
- Kuwajima, K. (1989). The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 6, 87-103.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Lakowicz, J.R. (1999). In *Principles of Fluorescence Spectroscopy, Second Ed.* 566 Plenum Press, New York, p. 237.
- Langevin, D. (2000). Influence of interfacial rheology on foam and emulsion properties. *Advances in Colloid & Interface Science*, 88, 209-222.
- Lapasin, R., Priel, S. (1995). *Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications*, Blackie Academic and Professional, London.

- Launay, B., Doublier, J.L., Cuvelier, G., (1986). Flow properties of aqueous solutions of polysaccharides. In *Functional Properties of Food Macromolecules*, Mitchell, J.R. and Ledward, D.A., Eds., Elsevier, London.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (1993). Principles of Biochemistry, 2nd ed., Worth Publishers, New York.
- Leiria Campo, V., Kawano, D.F., da Silva Jr., D.B., Carvalho, I. (2009). Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis: A review. *Carbohydrate Polymers*, 77, 167-180.
- Loisel, W., Gueguen, J., Popineau, A. (1993). A new apparatus for analyzing foaming properties of proteins. In K. D. Scwenke, & R. Pothes (Eds.), *Food proteins: structure and functionality*, VCH Publisher, New York, p. 320-323.
- Lucassen, J., van den Tempel, M. (1972). Dynamic measurements of dilatational properties of a liquid interface. *Chemical Engineering Science*, 27, 1283-1291.
- Lucassen Reynders, E.H., Lucassen, J., Garrett, P.R., Giles, D., Hollway, F. (1975). Dynamic surface measurements as a tool to obtain equation of state data for soluble monolayers. *Advances in Chemistry Series*, 144, 272-285.
- Lucassen Reynders, E.H. (1993). Interfacial viscoelasticity in emulsions and foams. *Food Structure*, 12, 1-12.
- MacGregor, E.A., Greenwood, C.T. (1980). *Polymers in Nature*, John Wiley, New York.
- Mackie, A.R., Gunning, A.P., Ridout, M.J., Wilde, P.J., Rodriguez Patino, J. M. (2001). In situ measurement of the displacement of protein films from the air/water interface by surfactants. *Biomacromolecules*, 2, 1001-1006.

- Mackie, A.R., Gunning, A.P., Wilde, P.J., Morris, V.J. (1999). Orogenic displacement of β -lactoglobulin from the air-water interface by sodium dodecyl sulphate. *Journal of Colloid & Interface Science*, 210, 157-166.
- Mackie, A.R., Gunning, A.P., Wilde, P.J., Morris, V.J. (2000). Orogenic displacement of protein from the oil-water interface. *Langmuir*, 16, 2242-2247.
- MacRitchie, F. (1978). Proteins at interfaces. *Advances in Protein Chemistry*, 32, 283-326.
- MacRitchie, F. (1990). Chemistry at interfaces. *Academic Press, San Diego, CA*.
- Makri, E.A., Doxastakis, G.I. (2007). Surface tension of *Phaseolus vulgaris* and *coccineus* proteins and effect of polysaccharides on their foaming properties. *Food Chemistry*, 101, 37-48.
- Madrid, A. (1979). Treatment of whey before processing. *Ind. Lact.*, 28, 18.
- Malaspina, A., Moretti, R.H. (1975). Preparation of a whey protein concentrate. US Patent, 3, 896, 241.
- Malysa, K., Lunkenheimer, K. (2008). Foams under dynamic conditions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 13, 150-162.
- Mangino, M.E., Liao, Y.Y., Harper, N.J., Morr, C.V., Zadow, J.G. (1987). Effects of heat processing on the functionality of whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 52, 1522-1524.
- Marshall, S.C. (1979). Advances in whey processing-demineralization and other fractionation processes. *New Zealand Journal of Dairy Science & Technology*, 14, 103.
- Martín-Diana, A.B., Fraga, M.J., Fontecha, J. (2002). Isolation and characterisation of casein-macropeptide from bovine, ovine, and caprine cheese whey. *European Food Research and Technology*, 214, 282-286.
- Martin-Diana, A.B., Frias, J., Fontecha, J. (2005). Emulsifying properties of whey protein concentrate and casein-macropeptide of cow, ewe and goat. *Milchwissenschaft*, 60, 363-367.

- Martínez, K.D., Baeza, R.I., Millán, F., Pilosof, A.M.R. (2005). Effect of limited hydrolysis of sunflower protein on the interactions with polysaccharides in foams. *Food Hydrocolloids*, 19, 361-369.
- Martínez, K.D., Carrera, C., Pizones, V., Rodríguez Patino, J.M., Pilosof, A.M.R. (2007). Effect of limited hydrolysis of soy protein on the interactions with polysaccharides at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 21, 813-822.
- Martínez, K.D., Carrera, C., Rodríguez Patino, J.M., Pilosof, A.M.R. (2009a) Interfacial and foaming properties of soy protein and their hydrolysates. *Food Hydrocolloids*, 23, 2149-2157.
- Martínez, M.J., Carrera, C., Rodríguez Patino, J.M., Pilosof, A.M.R. (2009b). Interactions in the aqueous phase and adsorption at the air-water interface of caseinoglycomacropeptide (GMP) and β -lactoglobulin mixed systems. *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces*, 68, 1, 39-47.
- Matthews, M.E., Doughty, R.K., Short, J.L. (1978). Pretreatment of acid casein wheys to improve processing rates in ultrafiltration. *New Zealand Journal of Dairy Science & Technology*, 13, 316.
- Matthews, M.E. (1979). Advances in whey processing -ultrafiltration and reverse osmosis. *New Zealand Journal of Dairy Science & Technology*, 14, 86.
- Matoba, T., Doi, E., Yonezawa, D. (1980). Digestibility of acetylated and succinylated proteins by pepsin-pancreatin and some intracellular peptidases. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44, 2323-2328.
- McClements, D.J., Monahan, F.J., Kinsella, J.E. (1993). Disulfide bond formation affects the stability of whey protein stabilized emulsion, *Journal of Food Science*, 58, 1036.
- McClements, D.J., Han, S.W., Dungan, S.R. (1994). Inter-droplet heterogeneous nucleation of super-cooled liquid droplets by solid droplets in oil-in-water emulsions, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 71, 1385.

- McClements, D.J. (1998). Analysis of Food Emulsions, in *Food Analysis, 2nd ed.*, Nielsen, S.S., Ed. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, p. 571-585.
- McClements, D.J. (2000). Comments on viscosity enhancement and depletion flocculation by polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 14, 173-177.
- McClements, D.J. (2005). *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*, CRC Press, New York.
- McClements, D.J. (2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 24, 6, 21-625.
- McDonough, F.E., Hargrove, R.E., Mattingly, W.A., Posati, L.P. Alford, J.A. (1974). Composition and properties of whey protein concentrates from ultrafiltration. *Journal of Dairy Science*, 57, 143-144.
- Mellema, M., Isenbart, J.G. (2004). Effect of acidification and heating on the rheological properties of oil-water interfaces with adsorbed milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 87, 2769-2778.
- Michon, C., Vigouroux, F., Cuvelier, G., Launay, B. (2000). Gelatin/iota-carrageenan interactions in non-gelling conditions. *Food Hydrocolloids*, 14, 3, 203-208.
- Miñones Conde, J., Rodríguez Patino, J.M. (2005). Rheological properties of hydrolysates of proteins from extracted sunflower flour adsorbed at the air-water interface. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 44, 7761-7769.
- Miñones Conde, J., Rodríguez Patino, J.M. (2007). The effect of enzymatic treatment of a sunflower protein isolate on the rate of adsorption at the air-water interface. *Journal of Food Engineering*, 78, 3, 1001-1009.
- Mishra, S., Mann, B., Joshi, V.K. (2001). Functional improvement of whey protein concentrates on interaction with pectin. *Food Hydrocolloids*, 15, 9-15.

- Mitchell, J.R. Ledward, D.A. (1986). *Functional Properties of Food Macromolecules*, Elsevier Applied Science, London.
- Moe, S.T., Grajet, K.I., Skjak-Braek, G., Smidsrod, O. (1995). Alginates. In Stephen, A. M. (Ed.). *Food polysaccharides and their applications*. Marcel Dekker, New York, p. 245-286.
- Morr C.V., Ha, E.Y.W. (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 431-436.
- Morr, C.V. (1989). Whey Protein Manufacture. In. *Developments in Dairy Chemistry*, 4. Ed. Fox. P.F., Elsevier Applied Science, London, p. 245-284.
- Morr, C.V. (1990). Effect of heating and elevated temperature storage on cheese whey. *Journal of Food Science*, 55, 1177-1179.
- Morr, C.V. (1992). Improving texture and functionality of whey protein concentrates. *Food Technology*, 46, 1, 10-113.
- Morr, C.V., Foegeding, E.A. (1990). Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: a status report. *Food Technology*, 44, 100-112.
- Mulvihill, D.M.; Kinsella, J.E. (1987). Gelation characteristics of whey proteins and β -lactoglobulin. *Food Technology*, 41, 102-111.
- Murray, B.S. (2002). Interfacial rheology of food emulsifiers and proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7, 426-431.
- Murray, B.S., Ettelaie, R. (2004). Foam stability: proteins and nanoparticles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9, 5, 314-320.
- Narayan, M., Berliner, L.J. (1997). Fatty acids and retinoids bind independently and simultaneously to β -lactoglobulin. *Biochemistry* 36:1906–1911.
- O'Donnell, C.D. (1995), Controlling the fat: What's new, what's to come, *Prepared Foods*, p. 65.

- Panyam, D., Kilara, A. (1996). Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in Food Science & Technology*, 7, 120-125.
- Papiz, M.Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E.E., North, A.C.T., Finlay, J.B.C., Sivaprasadarao, R., Jones, T.A., Newcomer, M.E., Kravlis, J.K. (1986). The structure of α -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*, 27, 383-388.
- Pavlovskaya, G.E., Semenova, M.G., Thzapkina, E.N., Tolstoguzov, V.B. (1993). The influence of dextran on the interfacial pressure of adsorbing layers of 11S globulin vicia faba at the planar n-decane/aqueous solution interface. *Food Hydrocolloids*, 7, 1-10.
- Permyakov, E.A., Berliner, L.J. (2000). α -Lactalbumin: Structure and function. *FEBS Letters*. 473, 269-274.
- Penzer, G.R. (1972). 1-Anilino-naphthalene-8-sulphonate. The dependence of emission spectra on molecular conformation studied by fluorescence and proton-magnetic resonance. *European Journal of Biochemistry*, 25, 218-228.
- Perez, M.D., Calvo, M. (1995). Interaction of β -lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: A review. *Journal of Dairy Science*, 78, 978-988.
- Pérez, O.E., Carrera C., Pilosof, A.M.R., Rodríguez Patino, J.M. (2009). Kinetics of adsorption of whey proteins and hydroxypropyl-methyl-cellulose mixtures at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 336, 2, 485-496.
- Phillips, L., Whitehead, D., y Kinsella, J. (1994). Functional properties of proteins. In *Structure-function properties of food proteins*. San Diego, California: Academic Press, INC.
- Piriz, M.L. (1993). Situación de la industria de los carragenanos en América del Sur. In: J. A. Zertuche Gonzalez, *Situación actual de la industria de macroalgas productoras de ficocoloides en America Latina y el Caribe D. F., México: FAO*. p. 66.

- Prins, A. (1988). Principles of foam stability. *In Advances in food emulsions and foams. Ed. Publishers L.T.D. Elsevier Applied Science. Ed. Dickinson, E., Stainsby, G. London, England.*
- Prins, A., Van Kalsbeek, H.K.A. (1998). Foaming behaviour and dynamic surface properties of liquids. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 3, 639-642.
- Qin, B.Y., Bewley, M.C. Creamer, L.K. Baker, E.N., Jameson, G.B. (1999). Functional implications of structural differences between variants A and B of bovine β -lactoglobulin. *Protein Science*, 8, 75-83.
- Reed, R.G., Putnam, F.W., Peters, T. (1980). Sequence of residues 400-403 of bovine serum albumin. *Biochemistry Journal*, 191, 867-868.
- Rha, C.K. Pradipasena, P. (1986). Viscosity of proteins. *In Functional Properties of Food Macromolecules, Mitchell, J.R. and Ledward, D.A., Eds., Elsevier, London.*
- Rodríguez Niño, M.R., Rodríguez Patino, J.M. (1995). Protein adsorption and protein-lipid interactions at the air-aqueous solution interface. *Colloids & surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, 103, 91-103.
- Rodríguez Niño, M.R., Carrera, C., Cejudo, M., Rodríguez Patino, J.M. (2001). Protein and lipid adsorbed and spread films at the air-water interface at the equilibrium. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 873-879.
- Rodríguez Niño, M.R., Rodríguez Patino, J.M. (2002). Effect of the aqueous phase composition on the adsorption of bovine serum albumin to the air-water interface. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 41, 1489-1495.
- Rodríguez Patino, J.M., Rodríguez Niño, M.R. (1999). Interfacial characteristics of food emulsifiers (proteins and lipids) at the air-water interface. *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces*, 15, 235-252.

- Rodríguez Patino, J.M., Carrera, C., Rodríguez Niño, M.R., Cejudo, M. (1999). Structural and dynamic properties of milk proteins spread at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 242, 141-151.
- Rodríguez Patino, J.M., Rodríguez Niño, M.R., Carrera, C. (2003). Protein-emulsifier interactions at the air water interface. *Advances in Colloid and Interface Science*, 8, 387-395.
- Rodríguez Patino, J.M., Carrera, C., Molina, S.E., Rodríguez Niño, M.R., Añón, M.C. (2004). Adsorption of soy globulins films at the air–water interface. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 43, 1681-1689.
- Rodríguez Patino, J.M., Rodríguez Niño, M.R., Carrera, C. (2007a). Physicochemical properties of surfactant and protein films. *Current Opinion in Colloid Interface Science*, 12, 187-195.
- Rodríguez Patino, J.M., Miñones Conde, Millán Linares, H., Pedroche Jiménez, J.J., Carrera, C., Pizones, V., Millán Rodríguez, F. (2007b). Interfacial and foaming properties of enzyme-induced hydrolysis of sunflower protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 21, 782-793.
- Rodríguez Patino, J.M., Rodríguez Niño, M.R., Carrera, C. (2008). Implications of interfacial characteristics of food emulsifiers in foam formulations. *Advances in Colloid Interface Science*, 140, 95-113.
- Rotenberg, Y., Boruvka, L., Neumann, A.W. (1983). Determination of surface tension and contact angle from the shapes of axisymmetric fluid interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 93, 1, 169-183.
- SAGPyA (2005). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la República Argentina. En: <http://www.sagpya.mecon.gov.ar>.
- Sanchez, C., Schmitt, C., Babak, V. G., Hardy, J. (1997). Rheology of whey protein isolate-xanthan mixed solutions and gels. Effect of pH and xanthan concentration. *Nahrung*, 41, 336-343.
- Sand, R. (1982). Structure and conformation of hydrocolloids. *In Food Hydrocolloids, Vol. I*,

- Glicksman, M., Ed., CRC Press, Boca Raton.*
- Sanderson, G.R. (1986). Gums and their use in food systems. *Food Technology*, 50(3), 81-85.
- Sawyer, L. (2003). β -Lactoglobulin. *In Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1 Proteins. 3rd ed. part A. P. F. Fox and P. L. H. McSweeney, ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York*, p. 319-386.
- Schaller, A. (2009). Sueros de Lechería. Cadenas Alimentarias. *Alimentos Argentinos*, 44, 20-24.
- Schmidt, K.A., Smith, D. E. (1992). Rheological properties of gum and milk protein interactions. *Journal of Dairy Science*, 75, 36-42.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., Hardy, J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 689-753.
- Schorsch, C., Jones, M.G., Norton, I.T. (1999). Thermodynamic incompatibility and microstructure of milk protein/locust bean gum/sucrose systems. *Food Hydrocolloids*, 13, 89-99.
- Scott, R.L. (1949). The thermodynamics of high polymer solutions. V. Phase equilibria in the ternary system: polymer1-polymer2-solvent. *Journal of Chemical Physics*, 17, 279-284.
- Scott, R.L. Hildebrand, J.L. (1951). The solubility of non-electrolytes. *Reinhold, New York*.
- Semenova, M. (1996). Factors determining the character of biopolymer-biopolymer interactions in multicomponent aqueous solutions modeling food systems. *In Macromolecular interactions in food technology. American Chemical Society*.
- Sharma, S. C. (1981). Gums and hydrocolloids in oil-water emulsion. *Food Technology*, 41, 59-67.
- Shaw, D.J. (1980). Introduction to Colloid and Surface Chemistry. *3rd ed., Butterworths, London*.
- Sloan, A.E. (1994). Top 10 trends to watch and work on. *Food Technology*, 48, 7, 89.
- Sloan, A.E. (1996). America's appetite '96: The top 10 trends to watch and work on. *Food Technology*, 50, 7, 55.

- Smithers, G.W., Copeland, A.D. (1997). International whey conference. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 119-123.
- Soedjak, H.S. (1994). Colorimetric determination of carrageenans and other anionic hydrocolloids with methylene blue. *Analytical Chemistry*, 66, 24, 4514-4518.
- Spahn, G., Santiago, L.G., Baeza, R., Pilosof, A.M.R. (2008). Whey protein concentrate / λ -carrageenan systems: Effect of processing parameters on the dynamics of gelation and gel properties. *Food Hydrocolloids*, 22, 1504-1512.
- Spellman, D., McEvoy E., O'Cuinn G., Fitzgerald R.J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH-stat methods of quantification of degree of hydrolysis. *Bioresource Technology*, 90, 249-254.
- Suttiprasit, F., Krisdahasima, V., McGuire, J. (1992). The surface activity of α -lactalbumin, β -lactoglobulin and BSA. *Journal of Colloid and Interface Science*, 154, 316-326.
- Syrbe, A., Bauer, W.J., Klostermeyer, H. (1998). Polymer science concepts in dairy systems. An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. *International Dairy Journal*, 8, 179-193.
- Thiansilakul, Y., Benjakul, S., Shahidi, F. (2007). Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chemistry*, 103, 1385-1394.
- Tolstoguzov, V.B. (1986). Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. In: J. R. Mitchell, & D. A. Ledward, *Functional properties of food macromolecules*, Elsevier Applied Science Publishers, London. p. 385-411.
- Tolstoguzov, V.B. (1997). Protein-polysaccharide interactions. In S. Damodaran, & A. Paraf (Eds.), *Food proteins and their applications in foods*, Marcel Dekker, New York. p. 171-198.

- Tolstoguzov, V.B. (1998). Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. In J. R. Mitchell, D. A. Ledward, & S. Hill (Eds.), *Functional properties of food macromolecules*, Blackie Academic and Professional, London. p. 252-277.
- Tolstoguzov, V.B. (2003). Some thermodynamics considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*, 17, 1, 1-23.
- Tornberg, E. (1978). The interfacial behaviour of three food proteins studied by the drop volume technique. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29, 762-776.
- Uruakpa, F.O., Arntfield S.D. (2006). Surface hydrophobicity of commercial canola proteins mixed with κ -carrageenan or guar gum. *Food Chemistry*, 95, 2, 255-263.
- Vaghela, M.N., Kilara, A. (1996). Foaming and emulsifying properties of whey protein concentrates as affected by lipid composition. *Journal of Food Science*, 61, 275-280.
- Van der Ven, C., Gruppen, H., de Bont, D.B.A., Voragen, A.G.J. (2001). Emulsion properties of casein and whey protein hydrolysates and the relation with other hydrolysate characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5005-5012.
- Van Holde, K.E. (1977). Effects of amino acid composition and microenvironment on protein structure. In *Food Proteins*, Whitaker, J.R. and Tannenbaum, S.R., Eds., AVI Publishing, Westport, CT.
- Vioque, J., Sánchez Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Millán, F. (2000). Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77, 1-4.
- Walstra, P. (1996). Disperse systems: basic consideration. In *Fennema Ed., Food Chemistry*, Marcel Dekker, New York.

- Walzem, R.L., Dillard, C.J. German, J.B. (2002). Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 353–375.
- Wang, Q., Cui, S. W. (2005). Understanding the physical properties of food polysaccharides. In *Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications*. Ed. S. W. Cui. CRC Press. Florida.
- Wang, T., Lucey, L.A. (2003). Use of multiangle laser light scattering and size exclusion chromatography to characterize the molecular weight and types of aggregates present in commercial whey protein products. *Journal of Dairy Science*, 86, 10, 3090-3101.
- Ward, A.F.H., Tordai, L. (1946). Time dependence of boundary tensions of solutions. *Journal of Chemical Physics*, 14, 353-361.
- Weinbreck, F., de Vries, R., Schroogen, P., de Kruif, C.G. (2003). Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. *Biomacromolecules*, 4, 2, 293-303.
- Whitaker, J.R. (1977). Denaturation and renaturation of proteins. In *Food Proteins*, Whitaker, J.R. and Tannenbaum, S.R., Eds., AVI Publishing, Westport, CT.
- Whistler R.L. (1973). Factors influencing gum costs and applications. In *Whistler R.L.; BeMiller J.N. (Eds.), Industrial gums, 2nd Ed., Academic Press, San Diego*.
- Whistler R.L., Daniel J.R. (1985). Carbohydrates. In *Fennema O.R. (Ed.). Food chemistry. 2nd Ed., Marcel Dekker, New York*.
- Wierenga, P.A., Meinders, M.B.J., Egmond, M.R., Voragen, F., de Jongh, H.H.J. (2003). Protein exposed hydrophobicity reduces the kinetic barrier for adsorption of ovalbumin to the air–water interface. *Langmuir*, 19, 21, 8964-8970.

- Wierenga, P.A., Kusters, H., Egmond, M.R., Voragen A.G.J., de Jongh H.H.J. (2006). Importance of physical vs. chemical interactions in surface shear rheology. *Advances in Colloid and Interface Science*, 119, 131-139.
- Wierenga, P.A., van Norel, L., Basheva, E.S. (2009). Reconsidering the importance of interfacial properties in foam stability. *Colloids & Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 344, 72-78.
- Wilde, P.J. (2000). Interfaces: their role in foam and emulsion behavior. *Current Opinion in Colloid & Interfaces Science*, 5, 176.
- Wilde, P.J., Clark, D.C. (1996). Foam formation and stability. In *Methods of testing protein functionality*, Ed. by G.M. Hall, Blakie Academic & Professional. p. 110-148.
- Wright, D.J., Hemmant, W. (1987). Foaming of protein solutions: comparison of large-scale whipping and conductimetric methods. *Journal of Food Science*, 35, 361-371.
- Xu, S., Damodaran, S. (1994). Kinetics of adsorption of protein at the air-water interface from a binary mixture. *Langmuir*, 10, 472-480.
- Ye, A., Hemar, Y., Singh, H. (2004). Influence of polysaccharides on the rate of coalescence in oil-in-water emulsions formed with highly hydrolyzed whey proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5491-5498.
- Zhu, H., Damodaran, S. (1994). Proteose peptones and physical factors affect foaming properties of whey protein isolate. *Journal of Food Science*, 59, 554-560.