

Tesis Doctoral:

GELIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE CAUPÍ DEL NORDESTE ARGENTINO

Tesista: Bioquímica Felicitas Peyrano

Director: Dr. Francisco Speroni

Co-Directora: Dra. M. Victoria Avanza



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura

Año 2018

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

- Laboratorio de Proteínas del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-UNLP-CONICET, La Plata, Argentina).
- Laboratorio del Área de Procesamiento de Alimentos del Instituto de Tecnología de Alimentos - Centro de Investigación de Agroindustrias (INTA Castelar, Hurlingham, Argentina).
- Laboratorio de la Planta de Procesamiento de Alimentos de ONIRIS, GEPEA (Nantes Francia).



...100g de manteca, 100 de azúcar, 250 de harina...
un chorrillo de vainilla, leche c/n
... 3 yemas, una lata de leche condensada,
jugo y ralladura de un limón
El merengue: el doble de azúcar que de claras

El gusto por la química,
habrá empezado en la cocina...

Dedico esta tesis a mis comensales de siempre:
Maggi, Colo y Fermín
Y a mis compañeros del SUM

Agradecimientos

A la Dra. María Victoria Avanza y al Dr. Francisco Speroni por dirigir esta tesis, por compartir sus conocimientos y por el permanente apoyo recibido durante estos años.

A la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la UNNE y al CONICET por haberme otorgado la beca que hizo posible la realización de este trabajo.

A la Secretaría General de Posgrado de la UNNE por los subsidios otorgados para poder viajar a La Plata.

A la Jefatura de Gabinete de Ministros de la Nación en el marco del Programa BEC.AR por la beca recibida para realizar mi estadía en Francia.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de la UNNE por la sólida formación académica recibida durante mi carrera de grado y a la Secretaría de Investigación y Posgrado por brindarme la posibilidad de realizar este doctorado.

Esta tesis me permitió encontrar compañeros y familias acá, allá y más allá... a los cuales agradezco de todo corazón por su apoyo:

Merci beaucoup a la Dra. Marie de Lamballerie y su grupo de investigación, especialmente a Gina, Cecilia y Anja.

A mi familia colombiana de Nantes: Judith y Daniel, gracias por el cariño y el hogar que me brindaron.

A la gente del INTA y a Claudio Sanow por procesar mis muestras en el equipo de altas presiones hidrostáticas.

A los chicos del laboratorio de proteínas del CIDCA por compartir mates, técnicas y llaves... por la ayuda y buena predisposición siempre.

A Andrea, que fue mi familia durante mis estadías en Buenos Aires y también fue más allá a compartir su amistad.

A mis compañeros de acá: Guada, Belén, Marga, Victoria, Adriana, Gonzalo, Enzo, Eliana, Melanie, Cinthia, Andrea, Karina, Melisa, Sonia por compartir el trabajo en el laboratorio y los festejos no superponibles en el SUM ... también especialmente a las "porotas" por hacerme sentir parte del grupo.

A mis amigos Bioquímicos Anita, Eli, Mati, Sergio y mi compa Luciano que me llamó un día para decirme que había algo sobre porotos que me podía interesar...

A mi gran familia: todos... los tíos, primos y sobrinos, a la Silvi, Daniela y la Pichi, a May, a Pali, a mamá, papá y Fer... y al nuevito.... MI TINO... por el inmenso cariño de todos los días.

Nuevamente.... A Pinty y a Fran... **MUCHAS GRACIAS!**

Los resultados de este trabajo de tesis fueron parcialmente publicados en dos artículos de revistas con referato y en cuatro comunicaciones a congresos:

- F. Peyrano, F. Speroni, M.V. Avanza (2016). Physicochemical and functional properties of cowpea protein isolates treated with temperature or high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 33, 38-46.
- F. Peyrano, M. de Lamballerie, M.V. Avanza, F. Speroni (2017). Calorimetric Study of Cowpea Protein Isolates. Effect of Calcium and High Hydrostatic Pressure. *Food Biophysics* 12, 1-9.
- Peyrano Felicitas, Avanza M. Victoria, Speroni Francisco. “Aislados proteicos de caupí. Propiedades fisicoquímicas y estructurales”. Presentado en modalidad de poster de trabajo de investigación en International Conference of FoodInovation-FoodInnova 2014. Universidad Nacional de Entre Ríos y Universidad Politécnica de Valencia. Ciudad de Concordia, Entre Ríos, Argentina, entre el 20 al 23 de octubre de 2014.
- Peyrano Felicitas, Speroni Francisco, Avanza María V. “Geles térmicos de aislado proteico de caupí”. Presentado en modalidad de poster de trabajo de investigación en el Séptimo Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos, INNOVA 2015 y Décimo Congreso Iberoamericano de Ingeniería de alimentos, CIBIA, desarrollado los días 7, 8 y 9 de octubre de 2015 en el LATU en Montevideo, Uruguay.
- Peyrano Felicitas, Speroni Francisco, Avanza María V., Pottier Laurance, Marie de Lamballerie. “Calcium addition to cowpea protein isolates induces changes on thermal properties and characteristics of gel obtained by thermal or high pressure treatments”. Presentado en modalidad de poster de trabajo de investigación en 9th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2016), del 25 al 29 de julio del 2016, en Toronto, Canadá.
- Peyrano Felicitas, Speroni Francisco, Avanza María V., Marie de Lamballerie. “Gelificación térmica de aislados proteicos de Caupí. Efecto del pre-tratamiento con altas presiones hidrostáticas. Efecto del agregado de calcio”. Presentado en

modalidad de poster de trabajo de investigación en VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICYTAC 2016) del 2 al 4 de Noviembre del 2016 en la ciudad de Córdoba, Argentina.

ÍNDICE

Resumen	I
Abreviaturas y Neologismos	VI
INTRODUCCIÓN	
1. Las legumbres y el caupí	1
2. Producción de legumbres y caupí en el mundo y la Argentina	3
3. Consumo y usos de legumbres y caupí	4
4. Proteínas vegetales	6
5. Propiedades funcionales de proteínas, relación con su estructura	8
6. Tratamientos para modificar las proteínas	10
6.1. Tratamientos térmicos	11
6.2. Tratamientos con altas presiones hidrostáticas	13
6.3. Proceso de extracción de proteínas vegetales	14
7. Gelificación proteica	15
8. Tratamientos para inducir la gelificación proteica	20
9. Hipótesis	22
10. Probables impactos y aportes de resultados	22
OBJETIVOS	
1. General	23
2. Específicos	23
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Preparación de la harina	24
2. Preparación de APC	24
2.1. Cálculo del rendimiento en peso y de proteínas totales	24
3. Composición centesimal	25
3.1. Contenido de proteínas	25
3.2. Humedad	25
3.3. Cenizas	25
3.4. Hidratos de carbono	25
4. Dispersiones proteicas de APC	25

4.1. Dispersiones acuosas al 1% p/p de proteínas	25
4.2. Dispersiones acuosas a diferentes concentraciones	26
4.3. Dispersiones acuosas a diferentes concentraciones con incorporación de calcio	26
4.4. Dispersiones acuosas de A10 con diferentes concentraciones de calcio	26
5. Tratamientos de las dispersiones proteicas	27
5.1. Tratamientos térmicos a dispersiones diluidas	27
5.2. Tratamientos con alta presión hidrostática a dispersiones diluidas	27
5.3. Tratamientos térmicos a dispersiones concentradas	28
5.4. Tratamientos con alta presión hidrostática a dispersiones concentradas	29
6. Efecto de TT y TAPH sobre propiedades fisicoquímicas y funcionales	29
6.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio	29
6.2. Espectroscopía de absorción en el UV	30
6.3. Espectroscopía de emisión de fluorescencia	30
6.4. Hidrofobicidad superficial	31
6.5. Propiedades térmicas. Calorimetría Diferencial de Barrido	31
6.6. Solubilidad	32
6.7. Capacidad de retención de agua	32
6.8. Viscosidad aparente	33
6.9. Concentración mínima de gelificación	33
7. Efectos in situ de las APH	34
7.1. Espectroscopia de absorción en el UV bajo APH	34
7.2. Espectroscopía de fluorescencia bajo APH	35
8. Proceso térmico de gelificación de APC. Efecto del pre-tratamiento con APH. Efecto de la incorporación de calcio	36
8.1. Reología dinámica de pequeña deformación	36
8.2. Variación de la concentración proteica	36
8.3. Variación de la temperatura de <i>plateau</i>	37
8.4. Variación de la velocidad de calentamiento y enfriamiento	37
8.5. Parámetros empleados para caracterizar el proceso térmico de gelificación de APC	37
8.6. Calorimetría diferencial de barrido (MICRO-DSC)	38
8.7. Determinación de la concentración del ion sodio y de la osmolaridad	38

9. Caracterización de dispersiones proteicas de A10 sometidas a TT o TAPH	39
9.1. Reología dinámica de pequeña deformación	39
9.2. Capacidad de retención de agua	39
9.2.1 WHC luego de centrifugación a altas velocidades	40
9.2.2 WHC luego de centrifugación a bajas velocidades	40
9.3. Propiedades de color	40
9.4. Solubilidad en diferentes medios desnaturalizantes	41
9.5. Microscópica electrónica de barrido	41
9.6. Perfil de textura de geles proteicos	41
10. Análisis estadístico de los datos	43

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I: Aislados proteicos de caupí.

Efecto de TT y TAPH sobre propiedades fisicoquímicas y funcionales.

1. Composición de harina y aislados proteicos de caupí	44
2. Efecto de TT y de TAPH sobre propiedades fisicoquímicas de APC	46
2.1. Caracterización molecular	46
2.2. Espectroscopía de absorción en el UV y de emisión de fluorescencia	48
2.2.1. Efectos irreversibles de los TT y TAPH	48
2.2.2. Efecto in situ de las APH	52
2.3. Hidrofobicidad superficial	59
2.4. Comportamiento térmico	60
3. Efecto de TT y TAPH sobre propiedades funcionales	62
3.1. Solubilidad proteica	62
3.2. Capacidad de retención de agua	64
3.3. Viscosidad aparente	65
3.4. Mínima concentración de gelificación	66
4. Conclusiones parciales	68

CAPÍTULO II: Proceso térmico de gelificación de APC.

Efecto del pre-tratamiento con APH. Efecto de la incorporación de calcio.

1. Caracterización del proceso térmico de gelificación de los APC	70
1.1. Condiciones críticas de gelificación	70
1.1.1. Concentración Crítica	70
1.1.2. Temperatura crítica o tiempo crítico	72
1.1.3. Relación con propiedades térmicas	74
1.2. Comportamiento reológico	77
1.2.1 Efecto de la concentración proteica	79
1.2.2. Efecto de la temperatura de <i>plateau</i>	81
1.2.3. Efecto de la velocidad de calentamiento y enfriamiento	84
2. Efectos del pre-tratamiento con APH en el proceso térmico de gelificación de APC	88
2.1. Condiciones críticas de gelificación	88
2.1.1. Concentración Crítica	88
2.1.2. Temperatura crítica o tiempo crítico de gelificación. Relación con propiedades térmicas.	89
2.2. Comportamiento reológico	91
2.2.1. Efecto de la concentración proteica	93
2.2.2. Efecto de la temperatura de <i>plateau</i>	97
3. Efecto de la incorporación de calcio en el proceso térmico de gelificación de APC	101
3.1. Condiciones críticas de gelificación	101
3.1.1. Concentración Crítica	101
3.1.2. Temperatura crítica o tiempo crítico de gelificación.	102
3.1.3. Relación con propiedades térmicas	104
3.2 Comportamiento reológico	106
3.2.1. Efecto de la concentración proteica	108
3.2.2. Efecto de la temperatura de <i>plateau</i>	111
4. Conclusiones parciales	113

CAPÍTULO III: Caracterización de geles obtenidos por TT o por TAPH de A10. Efecto de la incorporación de calcio.

Selección de las condiciones experimentales	115
1. Dispersiones proteicas de A10 sometidas a TT o TAPH	115
1.1. Comportamiento reológico	115
1.2. Capacidad de retención de agua	123
1.3. Propiedades de Color	124
1.4. Naturaleza de las interacciones proteicas de la matriz	126
1.5. Microestructura de la matriz proteica	130
1.6. Textura	133
1.7. Conclusiones parciales	135
2. Geles obtenidos a partir de A10 sometido a TT o a TAPH de A10. Efecto de la incorporación de calcio	137
2.1. Comportamiento reológico	141
2.2. Capacidad de retención de agua	147
2.3. Propiedades de color	148
2.4. Naturaleza de las interacciones proteicas de la matriz	151
2.5. Microestructura de la matriz proteica	153
2.6. Textura	154
2.7. Conclusiones parciales	156
CONCLUSIONES GENERALES	158
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	162
APÉNDICE I	175

RESUMEN

El caupí (*Vigna unguiculata*) es una leguminosa perteneciente a la familia Fabaceae, cultivada en el nordeste argentino por pequeños y medianos productores. Se lo utiliza como abono verde, en sistemas rotativos con otros cultivos anuales o en plantaciones frutales, para aumentar o mantener la fertilidad del suelo. Además esta legumbre posee un elevado contenido de proteínas (24,3 a 27,1%) de buena calidad nutricional. El caupí se puede considerar como una fuente de proteína vegetal poco explotada que podría introducirse como alimento ya sea en forma de grano entero o de sus derivados.

Los aislados proteicos de caupí (APC) pueden ser incorporados en la formulación de alimentos siempre que posean adecuadas propiedades funcionales. El objetivo general de esta tesis fue estudiar en profundidad la capacidad de gelificación de APC bajo distintas condiciones, de manera de obtener información que permita incorporar estas proteínas de alto valor nutricional en alimentos destinados al consumo humano.

Se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas de dos APC (A8 y A10, llamados según su pH de extracción, pH 8,0 y pH 10,0 respectivamente) y se evaluó el efecto de tratamientos térmicos (TT) y tratamientos con altas presiones hidrostáticas (TAPH) sobre las mismas. La concentración proteica empleada durante los tratamientos en esta etapa del trabajo fue relativamente baja (1% p/p de proteína) para evitar una agregación masiva, coagulación o gelificación. Los TT aplicados fueron a 70 o 90 °C, variando el tiempo (5, 10 o 30 min). Los TAPH se aplicaron a 200, 400 o 600 MPa durante 5 min. Los aislados no tratados y tratados se liofilizaron y analizaron a través de SDS-PAGE, fluorescencia intrínseca, hidrofobicidad superficial, y propiedades térmicas, agrupadas como propiedades fisicoquímicas; solubilidad, capacidad de retención de agua (WHC), viscosidad aparente y concentración mínima de gelificación (LGC), agrupadas como propiedades funcionales. Además, se estudió *in situ* el efecto de APH sobre la estructura terciaria de las proteínas, realizando espectros de absorción en el UV y espectros de emisión de fluorescencia cuando las dispersiones proteicas se encontraban sometidas a APH.

Las proteínas de caupí fueron sensibles a las distintas condiciones a las que estuvieron expuestas, desde la preparación de los APC hasta los tratamientos desnaturizantes (TT o TAPH). El pequeño grado de desnaturalización que presentó A10

a causa del cambio de pH durante la extracción produjo diferencias significativas con respecto a A8 en varias propiedades, principalmente en la hidrofobicidad superficial y también en la sensibilidad a los TT y TAPH. Estos aislados presentaron semejantes propiedades de solubilidad, WHC y viscosidad aparente, pero se diferenciaron en su capacidad de gelificación, en que A10 mostró mayor capacidad que A8.

Los TT y los TAPH indujeron cambios más drásticos en las propiedades fisicoquímicas y funcionales de A8 que en las de A10. La alta solubilidad en agua de los APC tanto antes como después de los tratamientos fue una característica destacable en el contexto de las proteínas vegetales. La solubilidad de A10 no cambió significativamente luego de los tratamientos y en muchas condiciones ensayadas fue mayor al 90%, en A8 se encontró el menor valor (72%) con el TT a 70 °C. Los TAPH fueron más eficientes que los TT para mejorar ciertas propiedades funcionales, como la LGC y la WHC de ambos aislados.

Se estudió el proceso térmico de gelificación de los APC y el efecto del pre-tratamiento con altas presiones hidrostáticas (APH) y de la incorporación de calcio sobre el mismo. Se determinaron condiciones críticas de gelificación (concentración y temperatura) y se relacionó con las propiedades térmicas de las proteínas de los APC. Además se evaluó el efecto de la concentración proteica, la temperatura y velocidad de calentamiento y enfriamiento del TT sobre el comportamiento reológico.

La capacidad de formar geles térmicos de los APC fue semejante a la de otras proteínas vegetales de reserva en términos de concentración crítica. Sin embargo, las proteínas de caupí presentaron una importante capacidad de establecer interacciones entre sí por lo que la gelificación térmica comenzó antes de que se alcanzara un alto grado de desnaturalización, lo que las diferenció de otras proteínas vegetales. Las propiedades reológicas de los geles obtenidos dependieron de la concentración proteica, la temperatura del TT y la velocidad de calentamiento y enfriamiento. A10 necesitó menor concentración que A8 para formar un gel. A las menores temperaturas (70 y 80 °C) A10 generó geles más elásticos que A8, mientras que a las temperaturas más altas (90 y 95 °C) las diferencias entre A8 y A10 se cancelaron, probablemente por el mayor grado de desnaturalización. Los valores de G' al final del ciclo sugieren que en las condiciones estudiadas de concentración proteica y fuerza iónica se pueden obtener geles de APC con buenas características reológicas con tratamientos térmicos a 80 °C, una temperatura relativamente baja para la gelificación de proteínas vegetales. La matriz de los geles estuvo

principalmente estabilizada por interacciones favorecidas por el enfriamiento como puentes de hidrógeno.

El pre-tratamiento con APH a bajas concentraciones proteicas no favoreció la gelificación térmica, pero aumentó las interacciones entre las proteínas durante el calentamiento dando soluciones más viscoelásticas. En cambio a altas concentraciones (a partir de 10,5% p/p) el pre-tratamiento con APH permitió obtener geles térmicos a menores temperaturas (50 o 60 °C dependiendo del nivel de presión utilizado). A partir de 90 °C, el fortalecimiento en A10 fue de gran magnitud solo a 400 MPa, mientras que en A8 no se detectaron cambios significativos con ningún valor de presión. En los geles obtenidos con pre-tratamiento con APH la contribución a G' generada durante el enfriamiento fue menor que en los no pre-tratados. Esto sugiere que las APH permitieron aumentar la proporción de interacciones hidrofóbicas en los geles térmicos, probablemente por el aumento de la hidrofobicidad superficial generado por el TAPH.

La presencia de calcio durante el proceso térmico de gelificación permitió obtener geles a menor concentración proteica pero con ciclos térmicos de altas temperaturas. Los iones calcio favorecieron el establecimiento de interacciones que no necesitan alto grado de desnaturalización (interacciones tipo iónicas dependientes de calcio), pero para alcanzar una matriz viscoelástica suficiente para formar un gel se requirió la desnaturalización proteica para establecer interacciones durante el calentamiento (del tipo hidrofóbicas). A bajas concentraciones (7,5% p/p) las diferencias entre A8 y A10 se cancelaron a temperaturas menores o iguales a 80 °C, a mayor temperatura (90 y 95 °C) las diferencias se evidenciaron.

La selección de uno u otro aislado dependería de las características texturales que se deseen obtener y las temperaturas a las que se deba someter el producto alimenticio, la elección de A10 sería ventajosa en la preparación de alimentos en que se requiriera aplicar TT de baja intensidad.

Finalmente se analizaron las características de dispersiones proteicas de A10 a diferentes concentraciones sometidas a TT o a TAPH, cada uno en dos niveles, 70 o 90 °C, y 400 o 600 MPa. Se evaluó el efecto de la concentración proteica y se caracterizaron los geles obtenidos. Además se estudió el efecto de la incorporación de calcio variando la concentración entre 0 y 40 mM trabajando con la menor concentración proteica (7,5% p/p).

Se pudo lograr la formación de geles débiles de A10 a partir de 10,5% p/p con TT de 20 min a 70 °C y a partir de 9,0% p/p con TT de 20 min a 90 °C. Con ambas

temperaturas de TT el aumento de la concentración proteica produjo geles térmicos más fuertes y duros con muy alta WHC, sin diferencias significativas en la dureza y WHC por el aumento de la temperatura.

La gelificación por APH requirió mayor concentración proteica que la gelificación térmica (a partir de 13,5% p/p al aplicar 400 MPa y a partir de 12% p/p al aplicar 600 MPa). El efecto de la concentración proteica no se pudo evaluar ya que el rango de concentraciones empleado generó solo uno o dos geles auto-portantes. Las propiedades de los geles obtenidos por TAPH fueron función del nivel de presión utilizada. Los geles a 600 MPa presentaron dureza y viscoelasticidad semejante a la de los geles térmicos, mientras que los geles a 400 MPa fueron más débiles. Los geles obtenidos por APH presentaron una matriz proteica compacta y homogénea como los geles térmicos pero con predominio de interacciones puente de hidrógeno y menor cantidad de puentes disulfuro. Las diferencias entre los tipos de tratamientos para lograr la gelificación probablemente se debieron a los diferentes fenómenos de desnaturalización-agregación. En el caso de los TAPH la mayor concentración y proximidad entre las moléculas sería el factor clave para generar una matriz viscoelástica ordenada de gel. Tanto los geles térmicos como los obtenidos por TAPH exhibieron una excelente WHC (mayor al 95% cuando fue evaluada en condiciones muy enérgicas).

La presencia de calcio estableció interacciones nuevas entre las proteínas de tipo iónicas dependientes de calcio, logrando gelificar las proteínas de A10 a menor concentración proteica (7,5% p/p) tanto por los TT como los TAPH. Estas nuevas interacciones proteína-proteína se dieron a costa de interacciones proteína-agua por lo que los geles obtenidos fueron de tipo particulados o agregados, con baja WHC y sinéresis espontánea. Este comportamiento dependió de la concentración de calcio y del nivel de temperatura o presión utilizado. Los geles térmicos con baja concentración de calcio (10 y 15 mM) presentaron características de geles tipo mixto, con matrices con estructuras de filamentos finos y de agregados, buen comportamiento reológico y buena WHC. En cambio los geles obtenidos por TAPH mejoran su comportamiento reológico a altas concentraciones de calcio (30 o 40 mM) pero mantuvieron una baja WHC. La incorporación de calcio varió la tonalidad marrón/ámbar de los geles de caupí a tonalidades blanquecina debido a la insolubilización proteica.

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten concluir que la capacidad de gelificación de APC es muy versátil ya que la aplicación de TT y TAPH (tanto durante la

gelificación o como pre-tratamiento), así como la incorporación de calcio modificaron las propiedades de los geles obtenidos. Esto representa un punto de partida para expandir el uso de proteínas de caupí mediante el desarrollo de nuevos productos con características texturales definidas. De esta forma se contribuye con información para la actual búsqueda de proteínas vegetales que reemplacen las de origen animal, lo que conduciría a beneficios tanto ecológicos como para la salud humana.

Abreviaturas y Neologismos

2-ME: 2-mercaptoetanol

A10: aislado proteico de caupí obtenido a pH 10,0 de extracción

A8: aislado proteico de caupí obtenido a pH 8,0 de extracción

Abs: absorbancia

ANS: 1,8-anilina naftaleno-sulfonato

ANOVA: análisis de varianza

APC: aislado proteico de caupí

APH: altas presiones hidrostáticas

auto-portante: adjetivo que caracteriza a un gel que mantiene su forma fuera de su molde

b.s.: base seca

baroprotección: disminución del efecto de las altas presiones hidrostáticas

BS: *buffer* salino

ca.: cerca, aproximadamente

CC: concentración crítica de gelificación

CSM: centro de masa espectral

desplegamiento: acción y efecto de desplegarse

DSC: calorimetría diferencias de barrido

GD: grado de desnaturalización

H₀: hidrofobicidad superficial

P_{EC}: punto de entrecruzamiento

P_{t0,3}: punto en el cual $\tan \delta \leq 0,3$

Q: crecimiento relativo de G' en la etapa de enfriamiento

SDS: dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

S_o: solubilidad proteica

tan δ : tangente del ángulo de desfase

TAPH: tratamiento con altas presiones hidrostáticas

TC: temperatura crítica de gelificación

Td: temperatura de desnaturalización

termograma: registro del flujo calórico en función de la temperatura

T_{offset}: temperatura final de la transición endotérmica

T_{onset}: temperatura de inicio de la transición endotérmica

TT: tratamiento térmico

WHC: capacidad de retención de agua

Introducción



1. Las legumbres y el caupí

Según el *Codex Alimentarius* se entiende por “legumbres” a las semillas secas de plantas de leguminosas, que se distinguen de las semillas oleaginosas por su bajo contenido de lípidos. En el Capítulo XI “Alimentos Vegetales” del Código Alimentario Argentino, se define con el nombre de legumbres, a los frutos y las semillas de las leguminosas. Siendo las leguminosas aquellas plantas cuyo fruto se encuentra dentro de una vaina. Las legumbres juegan un papel importante en la nutrición humana puesto que son fuentes de proteínas, energía, ciertos minerales y vitaminas (Deshpande, 1992). Los platos preparados con ellas y complementados con cereales como arroz o maíz, brindan proteínas de buen valor biológico. Las proteínas de los cereales son deficientes en ciertos aminoácidos esenciales, particularmente lisina (Amjad *et al.*, 2003), por su parte las legumbres contienen cantidades adecuadas de lisina, pero son deficientes en aminoácidos azufrados (metionina, cistina y cisteína) (Farzana y Khalil, 1999).

La Asamblea General de las Naciones Unidas proclamó al 2016 como el Año Internacional de las Legumbres (A/RES/68/231) y designó a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) para que facilite la celebración del Año en colaboración con los gobiernos, las organizaciones no gubernamentales y las demás organizaciones pertinentes. Se fijaron como objetivos específicos: concientizar sobre el importante papel de las legumbres en la producción sostenible de alimentos y en las dietas saludables, y su contribución a la seguridad alimentaria y nutricional; promover el valor y la utilización de las legumbres en el sistema alimentario, sus beneficios para la fertilidad del suelo y para combatir el cambio climático y la malnutrición; alentar las conexiones a lo largo de la cadena alimentaria para una mayor producción de legumbres, fomentar la investigación y la mejor utilización de la rotación de cultivos y el mejor aprovechamiento de las proteínas derivadas de las legumbres, y hacer frente a los retos del comercio de legumbres (FAO, 2016).

Las leguminosas comprenden cerca de 20000 especies y tienen gran importancia tradicional en la dieta tanto de Oriente como Occidente. Las familias correspondientes son leguminosas y fabáceas, y las principales especies que se explotan son porotos (*Phaseolus vulgaris*), arveja (*Pisum sativum*), lenteja (*Lens culinaris*), garbanzo (*Cicer arietinum*) y haba (*Vicia faba*). Existe un gran número de especies no explotadas que podrían introducirse como alimentos o sus derivados.

El caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp., sinónimo: *Vigna sinensis* L.) pertenece a la familia Fabaceae (Duke 1981). Es una leguminosa originaria de África (Vaillancourt y Weeden, 1992), y es comúnmente conocido también como poroto del ojo negro, alubia, poroto señorita, chícharo o frijol. El Código Alimentario Argentino (Capítulo XI, artículo 885) lo denomina poroto tape o caupí y lo describe como la semilla fresca o desecada de la planta *Vigna unguiculata* (Figura 1). Esta leguminosa es una planta de clima tropical o sub-tropical y se desarrolla bajo diversas condiciones de clima y suelos. Las temperaturas óptimas para su crecimiento y desarrollo se ubican entre los 20 y 35 °C. Son más tolerantes a las altas temperaturas y a las sequías que a las bajas temperaturas. Es un cultivo estival que tolera muy bien las altas temperaturas y las condiciones de estrés hídrico, similares a las que ocurren en la región del nordeste argentino (NEA) (Jover, 2006). La época y densidad de siembra es primavera y verano hasta fines de febrero, se siembran de 8 a 10 kg de semilla por hectárea y el rendimiento comercial de granos puede alcanzar los 2000 kg por hectárea (Jover, 2003). La cosecha de sus vainas se realiza a mano cuando las chauchas están secas y se procede de inmediato a su total secado al sol. Para obtener las semillas se procede al trillado de las chauchas de forma manual o con máquinas trilladoras o desgranadoras del tipo semi-estáticas. Los restos de vainas pueden ser usados para la alimentación del ganado o para cubrir el suelo en sistemas de huerta orgánica. También se utilizan como materia prima en la producción de lombricompost (Aguinaga, 2003).



Figura 1: a) Planta de *Vigna unguiculata*. b) Semillas de caupí variedad cuarentón. Estación Experimental El Sombrero, Corrientes (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-INTA).

Las semillas de caupí están compuestas por la cubierta o cáscara, los cotiledones, el embrión y el hilio u ojo de semilla. Difieren en cuanto a color y pueden ser: crema, marrón rojizo, negro y en algunas variedades presentan manchas pequeñas de diferentes tamaños;

presentan aspecto redondo u oval. Su textura puede ser lisa, áspera o rugosa (Albán, 2012). En la Figura 1b se presenta la variedad cuarentón de color crema con una mancha negra en el hilio. Es una de las variedades más conocidas en la región del NEA y se la llama vulgarmente “poroto señorita”.

2. Producción de legumbres y caupí en el mundo y la Argentina

De acuerdo al promedio de producción anual del año 2016 según la FAO, las legumbres más importantes a nivel mundial fueron los porotos (*Phaseolus*), seguido de las arvejas secas y garbanzos. Los caupíes ocuparon el cuarto lugar, seguido de habas y lentejas, presentando volúmenes de producción anual menores del diez por ciento de la producción total de legumbres (Figura 2).

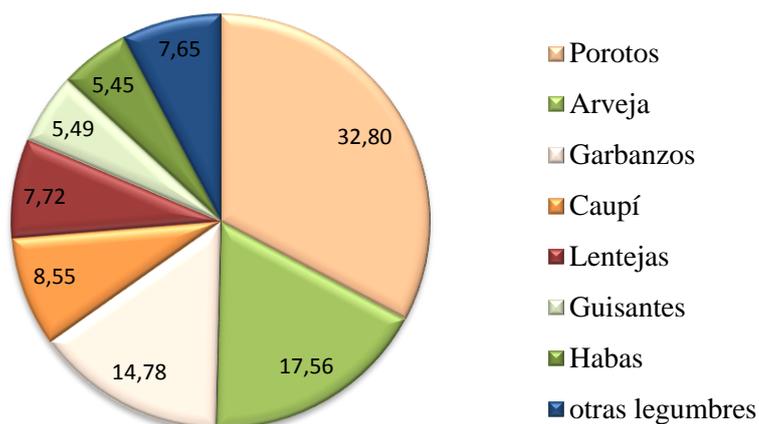


Figura 2: Producción mundial promedio de legumbres en porcentajes. Fuente: FAOSTAT, 2016.

Según datos de la FAO, en 2007 Brasil se destacó como el mayor productor mundial de porotos con una participación del 17,3%. Le siguieron India y China, que concentraron el 15,6% y el 10%, respectivamente. La producción mundial de porotos de 2007 ascendió a 19289231 toneladas, volumen cercano al promedio de los años 2002 - 2006 (19034149 toneladas). Cabe destacar que la producción argentina de porotos del año 2007 situó al país dentro de los primeros diez productores. Su participación fue del 1,7% respecto al total, e implicó obtener el puesto número nueve dentro del ranking. Con respecto al cultivo del caupí, Nigeria es el mayor productor mundial y Brasil el país con mayor superficie cultivada en América (Freire Filho *et al.*, 2002).

En la Argentina, en el año 2008 la producción total de legumbres ascendió a 406204 toneladas. El 83% correspondió a porotos, mientras que el 17% restante se repartió entre arvejas secas, lentejas y garbanzos. La principal provincia productora de porotos fue Salta (77%) y las provincias de Jujuy y de Tucumán, ocuparon el segundo y tercer lugar respectivamente. Según datos de la Cámara de Legumbres de la República Argentina en la campaña 2007 - 2008 el 48% del volumen obtenido correspondió a poroto alubia, el 34% a poroto negro y el 18% restante a otras variedades (Lezcano, 2009).

En el NEA el mercado regional se abastece de caupí producido en las provincias de Corrientes, Formosa, Chaco y Catamarca (Jover, 2003). Sin embargo, hay momentos del año donde no es posible conseguir este poroto. Se puede comprar caupí en ferias, almacenes, verdulerías y en el Mercado Concentrador de Corrientes. Además de abastecer el mercado regional, se vende caupí en el mercado nacional (Ciudad Autónoma y Gran Buenos Aires) y, de manera incipiente, se exporta a Paraguay, abasteciendo el mercado de la ciudad de Asunción (Alberto, 2005). Las escasas referencias disponibles sobre el mercado nacional de caupí, indican que es posible incrementar la oferta, con precios remunerativos, dado que la demanda no sería sobrepasada. Incluso, en algunos lugares de venta de legumbres secas en las ciudades de Buenos Aires y Santa Fe, el caupí es vendido como poroto, pero confundiénolo con el poroto común (*Phaseolus*). A nivel internacional, el MERCOSUR abre las posibilidades de exportación de productos primarios hacia Brasil, Paraguay, Venezuela y otros, lo cual permitiría transformar a nuestra región en exportadora de poroto caupí de consumo humano y de alta calidad. Siendo comercializado como grano seco, el caupí no tendría los inconvenientes que presentan otros productos primarios hortícolas o frutícolas, en los que el aspecto de pos-cosecha es de suma trascendencia (Jover, 2003).

3. Consumo y usos de legumbres y caupí

En Argentina el consumo *per cápita* de legumbres es bastante bajo respecto al de otros países donde estos alimentos se encuentran muy arraigados ya que forman parte de platos típicos. En el caso de los porotos, el 95 - 98% de la producción de cada campaña se destina al mercado externo, mientras que ingresa al país un 0,10 - 0,15% de porotos, excluyendo lo que se adquiere para la siembra. El consumo *per cápita* promedio de porotos en Argentina para el período 2002 - 2008 fue de 140 g/año y el consumo total de legumbres secas de 700 g anuales *per cápita* (Lezcano, 2009).

La producción de caupí, como grano para consumo humano o alimentación animal, está bastante difundida entre los pequeños productores del NEA, donde también se lo siembra como abono verde y mejorador de suelos por la fijación biológica de nitrógeno que realiza en simbiosis con bacterias del género *Bradyrhizobium*. Se lo emplea en sistemas de rotación de cultivos anuales o en plantaciones de frutales para aumentar o mantener la fertilidad del suelo (Jover, 2006).

En estudios previos Avanza *et al.* (2013) encontraron contenidos de proteínas de 24,3 a 27,1% para harinas de diferentes variedades de caupí, mostrándolo como una fuente atractiva de proteínas, alternativa a la proteína animal. Las proteínas del caupí, como otras proteínas vegetales, son menos costosas y su producción requiere menos energía, tierra y recursos hídricos que la producción de proteínas animales (Pimentel y Pimentel, 2003). Asumiendo un porcentaje de proteína bruta del 25% en la semilla de caupí, se tendrían alrededor de 500 kg/hectárea de proteínas, valor que se destaca en comparación con otros rubros regionales (Jover, 2003). Por lo anterior, el énfasis en los alimentos a base de proteínas vegetales también resultaría en beneficios ecológicos.

Las semillas de caupí presentan además un elevado contenido de hidratos de carbono, cercano al 70%, la mayoría fácilmente digestible. El contenido de lípidos es bajo (1,5%), y es una buena fuente de vitaminas del complejo B y minerales (Hierro, Potasio y Zinc) (Souza *et al.*, 2002).

El uso del caupí, así como el de las legumbres en general, como alimento ha sido limitado debido al sabor, el tiempo necesario para cocinarlo y la presencia de factores antinutricionales (polifenoles, taninos y ácido fítico). Se ha encontrado que los tratamientos térmicos convencionales, especialmente cocción y autoclavado, disminuyen el contenido de antinutrientes sin variaciones significativas de los componentes nutricionales del caupí (Avanza *et al.*, 2013). Estos métodos de procesamiento son simples y de bajo costo y utilizados cotidianamente en la preparación de alimentos en los hogares, por lo que la incorporación de caupí en platos regionales no sería un impedimento, aumentando el valor nutricional de los mismos.

Por otro lado a través del uso de aislados proteicos obtenidos a partir de las harinas de leguminosas las propiedades nutricionales podrían ser preservadas y los efectos negativos de los factores antinutricionales podrían ser eliminados (Horax *et al.*, 2004a). De esta manera se lograría aportar un valor agregado a un cultivo regional no explotado.

4. Proteínas vegetales

En las semillas existen tres grupos de proteínas según su función, las proteínas estructurales, las proteínas de reserva o almacenamiento y las proteínas biológicamente activas. Las proteínas de reserva son las más abundantes (más del 80%). Las proteínas se clasifican también según su solubilidad en: albúminas (solubles en agua), globulinas (insolubles en agua, pero solubles en soluciones salinas diluídas), prolaminas (solubles en alcoholes) y glutelinas (solubles en soluciones alcalinas) (Osborne, 1924). En el caupí las proporciones con respecto al total de proteínas son: globulinas del 70 a 45%, albúminas 60 a 50%, glutelinas 11 a 4% y prolaminas 2 a 0,7%. La variación en las proporciones de dichas fracciones se debe a la utilización de diferentes condiciones de extracción y a otros factores como variedad y condiciones de cultivo (Freitas *et al.*, 2004; Chan y Phillips, 1994) (Tabla 1). Avanza *et al.* (2015) determinaron el contenido de las fracciones proteicas del caupí cuarentón del NEA e informaron: globulinas $48 \pm 2\%$, albúminas $33 \pm 2\%$, glutelinas $8 \pm 1\%$ y prolaminas $2 \pm 0\%$ p/p en relación a las proteínas totales.

Desde un punto de vista estructural, las globulinas y glutelinas pertenecen a la misma familia de proteínas globulares, están formada por barriles de hojas β conectados por lazos muy cortos, lo que determina que tengan una estructura muy compacta (Dunwell, 1998). Las globulinas se pueden presentar bajo una estructura hexamérica (leguminas, 11S) o bien bajo una forma trimérica (vicilinas, 7S) (Müntz, 1998). En el caupí la fracción globulinas está compuesta principalmente por las vicilinas, al igual que en otras leguminosas como las arvejas (Horax *et al.*, 2004a). Dichas vicilinas están formadas principalmente por polipéptidos de 150 y 50 kDa. Freitas *et al.* (2004) caracterizan las vicilinas de caupí y las fraccionan en tres principales componentes (Tabla 1): α -vignina (globulina mayoritaria, no glicosilada, compuesta de una subunidad mayor de 80 kDa, que tras la reducción, produce dos polipéptidos de 20 y 60 kDa); β -vignina (también globulina mayoritaria, glicosilada, compuesta de dos polipéptidos principales de 55 y 60 kDa sin enlaces disulfuro) y finalmente, γ -vignina (globulina minoritaria, compuesta por un tipo de subunidad de 22 kDa con puente disulfuro intracatenario. Se ha encontrado que las vicilinas de *Vigna unguiculata* contienen residuos de triptófano a diferencia de otras leguminosas como *Pisum sativum* y *Phaseolus vulgaris*, por lo que su valor nutricional es superior (Rangel *et al.*, 2003).

Tabla 1: Fracciones proteicas de caupí. Caracterización molecular según diferentes autores

Fracción proteica	%	Composición de las subunidades (Masa molecular en kDa)	Puentes disulfuro	Glicosilación	
Globulinas	66,6 ^a	Mayoritarias: 65,60,56,50	no	60,56,50 ^a	
		Minoritarias: 28 – 42	no	29 ^a	
	51,0 ^b	α -vignina			
		Mayoritarias: 80 (60 + 20)	Inter- catenarios	no	
		Minoritarias: 44 – 58	no	no	
		β -vignina			
		Mayoritarias: 55,60	no	si	
		Minoritarias: 22, 24, 30, 66	no	no	
γ -vignina					
		Mayoritarias: 22	Intra- catenarios	no	
Albuminas	24,9 ^a	Mayoritarias: 99,91,32,30	no	no	
		Minoritarias: 28, 83 – 52	no	no	
	45,0 ^b	ND	ND	ND	
Glutelinas	4,7 ^a	101,68,31,29	no	no	
	3,0 ^b	ND	ND	ND	
Prolaminas	0,7 ^a	105,62,59,54	no	no	
	1,0 ^b	ND	ND	ND	

% de fracción proteica sobre el total de proteínas. ND = no determina. Fuentes: ^a Chan y Phillips (1994); ^b Freitas *et al.* (2004).

Por otra parte, las albúminas son la segunda fracción proteica mayoritaria de las semillas de caupí. Estas se caracterizan por ser un grupo heterogéneo de proteínas de coeficiente de sedimentación 2S, formado por polipéptidos cuyos pesos moleculares oscilan entre 99 y 34 kDa (Avanza *et al.*, 2015). La fracción albumina es donde se encuentra la mayor actividad inhibidora de tripsina y hemaglutinante de las proteínas de caupí (Vasconcelos *et al.*, 2010 y Freitas *et al.*, 2004).

La posibilidad de obtener aislados y/o concentrados proteicos constituye una de las grandes potencialidades de las semilla para la industria alimentaria. El uso de aislados proteicos, tiene como objetivo principal la eliminación lo más completa y selectiva posible de los compuestos no proteicos presentes en la harina (Vioque *et al.*, 2001). Este tipo de productos podrían ser utilizados como ingredientes alimentarios nutritivos en la medida

que posean adecuadas propiedades funcionales, nutricionales y/o biológicas (Horax *et al.*, 2004a).

5. Propiedades funcionales de proteínas, relación con su estructura

Las propiedades funcionales de las proteínas son propiedades no nutricionales que imparten a un alimento o ingrediente determinadas características sensoriales o determinado comportamiento físico durante su preparación, procesamiento, almacenamiento o consumo. Las propiedades funcionales juegan un rol importante en la expresión de los atributos sensoriales de los alimentos, definen la calidad del producto final así como también afectan el proceso de producción, almacenamiento y conservación de los mismos. Por lo tanto se las considera propiedades de importancia tecnológica. Se las puede clasificar según el tipo de interacción que predomina en el sistema en estudio (Cheftel *et al.*, 1989) en los siguientes grupos:

-Propiedades dependientes de la interacción proteína-agua: se las conocen también como propiedades de hidratación y algunas de ellas son: adsorción de agua, absorción de agua, retención de agua, hinchamiento, solubilidad, viscosidad, dispersibilidad (Pilosof, 2000a).

-Propiedades dependientes de las interacciones proteína-proteína: floculación, coagulación, gelificación, formación de estructuras (fibras, masas, películas) (Petruccelli, 1993).

-Propiedades de superficie o interfase: dependen de la interacción de las proteínas en dos fases inmiscibles por ejemplo agua–aceite (propiedades emulsificantes) y agua–aire (propiedades espumantes) (Wagner, 2000).

La funcionalidad de las proteínas tiene gran importancia tecnológica y existe un gran interés por conocer los mecanismos implicados en ella (Bartholomai y Pilosof, 2000). Se necesitan proteínas con funcionalidad específica para ser aplicadas en el desarrollo de alimentos con determinadas características texturales y organolépticas, principalmente en formulación de alimentos de contenido graso reducido, sin colesterol, alimentos para deportistas, de uso clínico o alimentos funcionales. Se emplean sistemas modelo sencillos para determinar parámetros que brindan información sobre su capacidad de contribuir a la propiedad de interés. Estas determinaciones no reflejan su comportamiento final en el

alimento, que es una matriz más compleja, pero resultan una primera aproximación muy importante como paso previo a la formulación de alimentos reales. En la Tabla 2 se muestran algunas propiedades relevantes de las proteínas para determinados alimentos.

Tabla 2: Propiedades funcionales de las proteínas exigidas por varios alimentos.

Alimentos	Funcionalidad exigida
Bebidas	Solubilidad a diferentes pHs, estabilidad frente al calentamiento, viscosidad.
Sopas y salsas	Viscosidad, emulsificación, retención de agua
Formación de masa, productos de panadería (pan, cakes, etc.)	Propiedades viscoelásticas, cohesión, desnaturalización por el calor, formación de gel, absorción de agua, emulsificación, formación de espuma.
Productos lácteos (queso untables o fundido, helados, etc.)	Emulsificación, retención de agua, viscosidad, formación de espumas, formación de gel, coagulación.
Sucedáneos de huevo	Formación de espuma, formación de gel.
Productos cárnicos (salchichas, embutidos)	Emulsificación, formación de gel, cohesión, retención de agua y grasa.
Extensores o sustitutos de la carne (proteínas vegetales texturizadas)	Absorción y retención de agua y grasa, insolubilidad, dureza, carácter masticable, cohesión, desnaturalización por el calor.
Recubrimientos	Cohesión, adhesión.
Productos de repostería	Dispersabilidad, emulsificación

Fuente: Cheftel *et al.*, 1989.

Los atributos funcionales críticos requeridos para la formulación de alimentos con un aislado proteico son: adecuada solubilidad, absorción de agua, gelificación, capacidad espumante y emulsificante, y buenas propiedades sensoriales (Damodaran, 1989). Por lo

tanto, los aislados proteicos de caupí (APC) pueden ser utilizados como ingredientes y suplementos alimenticios dependiendo de sus propiedades funcionales. Sefa-Dedeh y Yiadom-Farkye (1988) observaron que los APC mostraron mejor capacidad de absorción de aceites que sus harinas correspondientes. Los APC, dada la alta solubilidad de sus proteínas tanto a pHs ácidos como básicos, pueden ser usados como ingredientes en la formulación de bebidas. Al comparar sus propiedades con las correspondientes a aislados de soja, los APC mostraron menor capacidad de emulsificación, pero semejante estabilidad de las emulsiones. En relación a la gelificación, los APC requirieron mayor concentración proteica (12 vs. 10% p/v) y mayor tiempo (40 min vs. 30 min) a 70 °C que los aislados proteicos de soja para gelificar (Horax *et al.*, 2004b). Potencialmente, ciertas modificaciones estructurales de los componentes de los APC podrían mejorar sus propiedades funcionales (Horax *et al.*, 2004b).

Las propiedades funcionales de las proteínas están relacionadas con su estructura tridimensional, influenciadas por variables ambientales tales como temperatura, pH y fuerza iónica durante el aislamiento de proteínas y también durante el procesamiento de alimentos: fabricación, preparación y/o almacenamiento (Kinsella y Melachouris, 1976; Petruccelli y Añón, 1994; Mwasaru *et al.*, 1999b). Usualmente, en primer término se estudian las propiedades fisicoquímicas y estructurales como masa molecular, estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, composición aminoacídica, distribución de cargas, carga neta, relación hidrofobicidad/hidrofilicidad y flexibilidad molecular (Damodaran, 1989), con el fin de relacionarlas con las propiedades funcionales y comprender sus mecanismos.

Por lo tanto, conocer la relación entre estructura proteica y funcionalidad es la base para el diseño racional de ingredientes proteicos con funcionalidad específica para ser aplicados en el desarrollo de alimentos con características determinadas (Bartholomai y Pilosof, 2000).

6. Tratamientos para modificar las proteínas

Los cambios en la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria, sin modificación de la estructura primaria (sin ruptura de los enlaces peptídicos), son usualmente denominados desnaturalización. La desnaturalización es un fenómeno complejo, durante el cual aparecen conformaciones nuevas. El estado final de la desnaturalización puede corresponder a una estructura polipeptídica totalmente desplegada, en la que son transitorias las interacciones

proteína-proteína y proteína-solvente. Sin embargo, un aumento del nivel de estructura, por encima del nivel de la estructura natural, también puede considerarse como una forma de desnaturalización (Cheftel *et al.*, 1989).

Muchas veces la desnaturalización proteica tiene una connotación negativa por que implica la pérdida de algunas propiedades de las proteínas. En la industria alimenticia estos efectos suelen ser deseables y son el fundamento para seleccionar y aplicar algún determinado tratamiento. La desnaturalización proteica de una enzima produce pérdida de su actividad biológica por lo que se utiliza para la conservación de alimentos. La desnaturalización térmica de los inhibidores de la tripsina en las leguminosas mejora acusadamente la digestibilidad y la disponibilidad biológica de las proteínas ya que aumenta el incremento a la susceptibilidad al ataque de proteasas. Con respecto a las propiedades funcionales la desnaturalización proteica puede perjudicar las mismas, por ejemplo pérdida de la solubilidad, modificación de la capacidad de fijación de agua, entre otras; o bien ser un requisito necesario para que las proteínas presenten capacidad de gelificar, formar espumas o emulsiones (Gálvez Mariscal *et al.*, 2013; Cheftel *et al.*, 1989; Kinsella y Melachouris, 1976).

La modificación de la estructura proteica y en consecuencia la de sus propiedades funcionales es consecuencia del procesamiento de alimentos, la determinación de las condiciones adecuadas es requisito para mejorar las propiedades funcionales y lograr la aceptación del consumidor. Los cambios en las características fisicoquímicas se pueden lograr durante el aislamiento de las proteínas y/o durante la preparación de los alimentos mediante tratamientos físicos, químicos y/o enzimáticos (Cheung y Wanasundara, 2014; Mirmoghtadaie *et al.*, 2016).

6.1. Tratamientos térmicos

Los tratamientos térmicos (TT) son los más tradicionales en el procesamiento de alimentos y afectan la estructura nativa de las proteínas (Kinsella y Melachouris, 1976). La desnaturalización térmica conduce a la disociación de las proteínas en sus subunidades, al desplegamiento de su estructura y a la exposición de sus grupos hidrófobos (Privalov, 1979). En alimentos basados en proteínas de leguminosas la aplicación de calor como agente desnaturalizante se utiliza con frecuencia debido a que facilita la digestión de las proteínas y logra desnaturalizar e inactivar los inhibidores de las proteasas. La aplicación de calor afecta la estabilidad de las interacciones no covalentes que estabilizan la estructura

terciaria de las proteínas, pues se eleva la entalpía de las moléculas y se rompe el equilibrio de los enlaces (Gálvez Mariscal *et al.*, 2013). Las interacciones del tipo puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y electroestáticas son procesos entálpicos y exotérmicos, por lo cual se desestabilizan a altas temperaturas y se estabilizan a bajas temperaturas. Por otro lado, las interacciones hidrofóbicas son producidas como consecuencia del aumento de entropía cuando menos cadenas laterales hidrofóbicas se expongan al contacto con el medio acuoso. Por lo tanto, se comportan de una forma opuesta con la temperatura, se estabilizan a altas temperaturas y se desestabilizan a bajas temperaturas. En el proceso térmico de desnaturalización las interacciones hidrofóbicas se refuerzan a medida que se eleva la temperatura pero en un momento se desestabilizan por el aumento de entropía de las moléculas de agua (disminución del nivel de estructura del solvente), por lo que su mayor estabilidad se da entre 60 y 80 °C (Myers, 1990; Gálvez Mariscal *et al.*, 2013).

Puesto que al afectar la estructura de las proteínas se afectan también las propiedades funcionales de las mismas en los alimentos es importante realizar un análisis de los procesos termodinámicos involucrados. La asociación-disociación y agregación por calentamiento han sido ampliamente estudiadas en proteínas de soja (Petruccelli y Añón, 1995), avena (Ma y Harwalkar, 1988), frijol (Tang y Ma, 2009), entre otras semillas. El procesamiento térmico de lentejas y arvejas produjo la disminución de la capacidad de formar emulsiones, espumas y geles de las harinas de dichas legumbres (Aguilera *et al.*, 2009). Se ha estudiado el efecto de TT en aislados proteicos ricos en vicilinas de tres tipos de *Phaseolus*, determinando que la susceptibilidad y flexibilidad térmica dependía del tipo de proteína, afectando de diferentes maneras la solubilidad y propiedad emulsificante de dichos aislados (Tang *et al.*, 2009). En las proteínas de caupí se ha estudiado que el procesamiento térmico afecta las propiedades funcionales de la harina incrementando la capacidad para absorber agua y grasa, pero disminuyendo la capacidad espumante, así como la estabilidad de las espumas formadas (Granito *et al.*, 2004). El procesamiento de remojado y cocción de las semillas de caupí provocó la disminución de la solubilidad y la capacidad de emulsificación de las harinas así como también perjudicó la capacidad de formar geles (Prinyawiwatkul *et al.*, 1997). Avanza *et al.*, (2012), observaron un aumento significativo en la capacidad de absorción de agua y aceite, capacidad de imbibición de agua y disminución de la solubilidad proteica de las harinas al ser tratadas térmicamente (cocción y autoclave) las semillas de caupí. Hasta el momento no se han informado estudios sobre modificación de las propiedades funcionales de APC por TT.

6.2. Tratamientos con altas presiones hidrostáticas

Los tratamientos con altas presiones hidrostáticas (TAPH) representan una tecnología emergente en la industria alimentaria. En las últimas décadas, han demostrado constituir una opción adecuada para satisfacer la demanda de alimentos de alta calidad, mínimamente procesados, libres de aditivos y microbiológicamente seguros. Si bien se enfocan en la preservación de los alimentos, también producen cambios en los componentes macromoleculares e inducen modificaciones en la estructura y propiedades finales del alimento, preservando moléculas pequeñas como aminoácidos, vitaminas, moléculas portadoras del *flavor*, entre otras (O'Reilly *et al.*, 2001; Knorr *et al.*, 2006).

A diferencia de la desnaturalización inducida por la temperatura, que habitualmente tiene lugar en el intervalo de 40-80 °C a una presión de 1 atmósfera, la desnaturalización inducida por la presión puede tener lugar a temperaturas ambiente o menores, si la presión es suficientemente alta. La mayor parte de las proteínas sufre algún nivel de desnaturalización inducida por la presión en el rango de 100-1200 MPa (Heremans, 1982). La desnaturalización de las proteínas inducida por la presión se debe fundamentalmente a que las proteínas son flexibles y compresibles. Aunque los restos aminoacídicos estén densamente empaquetados en el interior de las proteínas globulares, siempre existen espacios vacíos, lo que les confiere cierta compresibilidad (Gekko y Hasegawa, 1986). La desnaturalización de las proteínas globulares inducida por la presión suele ir acompañada de una reducción de su volumen específico y del volumen total del sistema en que se encuentran. La disminución de volumen se debe a dos factores: la eliminación de espacios vacíos cuando la proteína se despliega y la hidratación de los restos aminoacídicos apolares expuestos durante el desplegamiento. La desnaturalización inducida por la presión puede ser reversible. La mayor parte de las enzimas, en disoluciones diluidas, recuperan su actividad cuando la presión desciende de nuevo a la atmosférica, dependiendo del nivel de presión alcanzado (Weber, 1992). Los TAPH se utilizan para la inactivación microbiana ya que presiones en el rango de 200 a 1000 MPa dañan irreversiblemente las membranas celulares y disocian las organelas de los microorganismos, por lo que inactivan sus formas vegetativas (Hayashi, 1991). Existen trabajos sobre el estudio de la modificación de la estructura proteica a causa de las APH para modificar las propiedades funcionales de las proteínas. A diferencia del tratamiento térmico, el tratamiento a altas presiones hidrostáticas no daña a los aminoácidos esenciales y no altera el color o el aroma ni genera compuestos tóxicos. Por tanto, en ciertos productos, el procesado por medio de la presión

hidrostática puede resultar ventajoso, a pesar de que es una tecnología costosa (Damodaran, 2010).

Los TAPH producen un grado variable de desnaturalización de proteínas que depende principalmente del nivel de presión aplicado y la composición del medio. Se ha reportado, para proteínas de soja, que los TAPH producen la disociación de polipéptidos, modificación de su hidrofobicidad superficial y agregación, afectando la solubilidad y otras propiedades funcionales, así como también la formación y la interrupción de enlaces no covalentes y cambios en la conformación e hidratación (Puppo *et al.*, 2004; Speroni *et al.*, 2010a y Añón *et al.*, 2011). Se estudió el efecto combinado de los TT y TAPH en la propiedad emulsificante de aislado proteico de soja demostrando mejora en la estabilidad de las emulsiones y aumento de la viscosidad de las mismas por gelificación de las proteínas dependiendo del nivel de presión utilizado y concentración proteica (Puppo *et al.*, 2008). Las APH provocaron la desnaturalización de proteínas de amaranto provocando la formación de agregados dependiendo del nivel de presión utilizado y la concentración proteica de las dispersiones durante el tratamiento (Condés *et al.*, 2012). Se encuentran numerosos estudios semejantes sobre el efecto de los TAPH sobre otras proteínas vegetales como las de lupino (Chapleau y de Lamballerie-Anton, 2003), frijol rojo (Yin *et al.*, 2008), aislado proteico de canola (He, R. *et al.*, 2014), aislado proteico de maní (He, X. H. *et al.*, 2014) pero hasta el momento no se han publicado trabajos sobre el efecto de las APH sobre las proteínas de caupí.

6.3. Proceso de extracción de proteínas vegetales

La estructura proteica puede modificarse durante el proceso de extracción de las proteínas vegetales. Uno de los procesos de obtención de aislados proteicos se basa en la solubilización de la proteínas a pH alcalino, seguido por precipitación isoeléctrica (pHs ácidos cercanos al punto isoeléctrico). Las proteínas pueden desnaturalizarse por variación del pH, el grado de desplegamiento es mayor a pHs extremos alcalinos que a pHs extremos ácidos. Esto es debido a la ionización de los grupos sulfhidrilos, fenólicos y carboxílicos, que despliegan la cadena polipeptídica al exponerse al ambiente acuoso. La desnaturalización inducida por el pH suele ser reversible. Sin embargo, en algunos casos, a pH alcalino, se hidrolizan algunos enlaces peptídicos, se desaminan los restos de asparagina y glutamina, se destruyen grupos sulfhidrilos y se producen agregaciones que pueden desnaturalizar irreversiblemente las proteínas (Damodaran, 2010). El pH estándar

de extracción para proteínas de almacenamiento de diferentes semillas es 8,0 (Horax *et al.*, 2004a; Petruccelli y Añón, 1995). Mwasaru *et al.* (1999a) probaron diferentes condiciones de extracción de proteínas (pH entre 8,5 y 12,5) y reportaron desnaturalización proteica incluso al pH más bajo probado. Por otra parte, los pHs extremadamente altos inducen la formación de lisinoalanina, aminoácido tóxico. Schwass y Finley (1984) encontraron que la lisinoalanina se produce en niveles significativos cuando se aumenta el pH de 8,0 a 10,0, pero fue mínima al trabajar a bajas temperaturas (20 °C) y durante 60 min en aislados proteicos de soja. Por lo tanto, la relación entre la calidad de la proteína y los parámetros de procesamiento merece una extensa investigación (Rivas *et al.*, 1981). Una forma sencilla y poco costosa de modificar la estructura proteica podría ser el aumento del pH durante la extracción de proteínas. Además, esta reportado que estrategia aumenta el rendimiento proteico e influye en los perfiles de otros compuestos presentes en los aislados proteicos (Speroni *et al.*, 2007; Avila-Ruiz *et al.*, 2016).

De esta forma, a través del proceso de extracción o por tratamientos posteriores las proteínas pueden ser modificadas para ser usadas como ingredientes funcionales con características innovadoras o “a medida”.

7. Gelificación proteica

Un gel es una fase intermedia entre un sólido y un líquido. Ferry (1948) define a un gel como un sistema sustancialmente diluido, el cual no muestra flujo en estado estacionario. La gelificación se logra al entrecruzar un polímero mediante uniones, covalentes o no covalentes, para formar una red capaz de atrapar moléculas del solvente y sustancias de bajo peso molecular (Gálvez Mariscal *et al.*, 2013). La gelificación proteica consiste en la formación de una red tridimensional inmersa en un solvente (agua) que exhibe cierto grado de orden a causa de las interacciones moleculares proteína-proteína y proteína-agua. En esta red existe un balance crítico entre las fuerzas repulsivas y atractivas entre las moléculas (Kinsella y Melachouris, 1976).

Las interacciones atractivas incluyen a las fuerzas de Van der Waals (de corto alcance), las interacciones hidrofóbicas (originadas por el aumento de entropía que supone disminuir el grado de hidratación hidrofóbica, potenciadas por las temperaturas elevadas), electrostáticas (entre residuos aminoácidos con cargas opuestas, moduladas por la fuerza iónica), puentes de hidrógeno (establecidos entre dos residuos aminoácidos o entre un residuo aminoácido y agua, potenciados por el enfriamiento), e interacciones covalentes

(puentes disulfuro o catalizadas por enzimas). En la Tabla 3 se resumen algunas de las características de las interacciones proteínas-proteína. Las interacciones repulsivas incluyen las electrostáticas (entre residuos aminoacídicos con cargas iguales, actúan principalmente a pHs alejados del punto isoeléctrico) y los volúmenes de exclusión (originadas en la repulsión entre nubes de electrones).

Tabla 3: Enlaces e interacciones proteína-proteína

Interacción	Energía (kJ/mol)	Distancia (Å)	Grupo funcional implicado	Agentes desnaturizantes	Condiciones favorables
Enlaces covalentes	330 - 380	1 - 2	Cistina S-S	Agentes reductores: Mercaptoetanol, cisteína, ditioneitol, sulfitos	
Enlaces puente de hidrógeno	8 - 40	2 - 3	Amida, hidroxilo, fenol	Disoluciones de urea, clorhidrato de guanidina, detergentes, calor	Frío
Interacciones hidrofóbicas	4 - 12	3 - 5	Aminoácidos alifáticos y aromáticos	Detergentes, disolventes orgánicos	Calor
Interacciones electrostáticas	42 - 84	2 - 3	Grupo carboxilo (-) y amina (+)	Soluciones salinas, pH bajos o elevados	
Fuerzas de Van der Waals	1 - 9		Dipolos permanentes, inducidos e instantáneos		

Fuente: Cheftel *et al.*, 1989.

El conjunto de estas interacciones proteína-proteína y proteína-agua mantiene separadas a las cadenas polipeptídicas favoreciendo la formación de una matriz distribuida ordenadamente en el espacio capaz de retener agua (Heertje, 1993). La contribución de cada tipo de interacción depende de la estructura de las proteínas en el momento de la gelificación, así como del pH, de la presencia de otras sustancias, de la fuerza iónica del medio, de la temperatura y de las velocidades con que se aplican los tratamientos físicos y/o químicos para lograr la gelificación (Utsumi y Kinsella, 1985a y b; Damodaran, 1988; Puppo *et al.*, 1995).

Las interacciones involucradas en la formación de la red son principalmente puente de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, cuya contribución varía con el tipo de proteína, condiciones de calentamiento, el grado de desnaturización y las

condiciones ambientales. Los geles que se forman por ciertas interacciones no covalentes como puentes de hidrógeno son térmicamente inestables, reversibles y cuando se calientan de nuevo se funden a un estado de progel, como se observa con los geles de gelatina. Los geles donde predominan las interacciones hidrofóbicas por lo general son resistentes a elevadas temperaturas e irreversibles, como los geles de clara de huevo y de proteínas vegetales. Las proteínas que contienen restos de cisteína y cistinas polimerizan vía interacciones puente disulfuro y también son térmicamente irreversibles (Nemati *et al.*, 2004; Meng *et al.*, 2002; Molina Ortiz y Wagner, 2002).

En la mayoría de los casos la gelificación proteica requiere la previa desnaturalización, que puede ser total o parcial (Hermansson, 1978). El grado de desnaturalización alcanzado y el tipo de tratamiento desnaturalizante determinarán la estructura de la matriz proteica que formará el gel. El momento (antes o durante la gelificación) y las condiciones (concentración proteica, pH, fuerza iónica, etc.) en que se produzca la desnaturalización condicionarán las estrategias de formación de gel y sus características finales. Según Hermansson (1986) la formación de un gel es un proceso complejo que involucra reacciones de desnaturalización, disociación-asociación y agregación. Esta autora divide a los geles proteicos en dos tipos: los geles formados por agregación desordenada (*random*) a través de un proceso rápido y los formados por asociación de moléculas de una manera más ordenada en hebras a través de un proceso más lento. Las proteínas con grandes cantidades de aminoácidos no polares se agregan al desnaturalizarse y forman agregados insolubles que se asocian al azar formando geles tipo coágulos, irreversibles. Estas proteínas forman el gel aun cuando se esté calentando la solución, porque la velocidad de agregación y formación de red es mayor que la de desnaturalización. La red que se obtiene es desordenada y dispersa la luz, lo que da una apariencia opaca. En contraste, las proteínas con cantidades pequeñas de aminoácidos no polares forman complejos solubles al desnaturalizarse. La velocidad de asociación de estos agregados facilita la formación de un gel ordenado translúcido (Guo *et al.*, 2012).

Barbu y Joly (1953) encontraron que si la repulsión entre las moléculas es grande se forman agregados lineales, en cambio si la repulsión es pequeña y existen grandes fuerzas de atracción entre las moléculas se forman agregados globulares *random*. Tombs (1970) postuló que en el proceso de gelificación la agregación sería más importante que el desplegamiento de las proteínas, distinguiendo que se pueden formar geles con agregación ordenada o agregación desordenada.

Hermansson y Langton (1994) clasificaron a los geles basándose en la presencia de filamentos o agregados gruesos. Los geles formados por filamentos finos correspondientes a polímeros lineales, asociados en forma ordenada y no covalente son transparentes, retienen mucha agua y son termorreversibles. Esta estructura es típica de polisacáridos, y es poco común en los geles proteicos salvo para proteínas fibrosas como el colágeno o la miosina. Las proteínas globulares pueden formar geles transparentes y con buena retención de agua cuando se encuentran relativamente lejos del punto isoeléctrico, en este caso las proteínas se unen en forma ordenada mediante uniones covalentes y no covalentes formando hebras (“collar de perlas”). Por último, la formación de geles agregados ocurre a pHs cercanos al punto isoeléctrico, por desnaturalización parcial de la proteína o por la presencia de sales y por una agregación aleatoria. Los geles agregados son opacos y tienen menor capacidad de retención de agua (Pilosof, 2000b). Foegeding *et al.* (1995) establece tres categorías para los geles de proteínas globulares, además de los finos y particulados ya descritos, agrega la clasificación de geles de tipo mixtos. Estos geles estarían constituidos por ambos tipos de estructuras y sus propiedades serían intermedias.

Aunque una característica crucial de los geles es la retención de agua, algunos de ellos liberan parte de su fase líquida de forma espontánea. A este fenómeno se lo denomina sinéresis. El líquido liberado en la sinéresis es por lo general un sol diluido (es decir una dispersión de las proteínas). La sinéresis en geles se ve influenciada por varios factores: es afectada por el pH del sistema y es máxima cercana al punto isoeléctrico, la temperatura a la que se mantiene el gel puede afectar la sinéresis, y la naturaleza de la fase dispersa y la matriz formada tiene también efecto sobre la sinéresis (Gálvez Mariscal *et al.*, 2013).

La estabilidad de un gel ante fuerzas mecánicas y térmicas depende del número y tipo de interacciones formadas. Los geles presentan varios grados de rigidez y elasticidad, y muestran estructuras sólidas y semisólidas. El mecanismo de conversión de sol a gel, no está del todo aclarado, por lo que se han propuesto numerosas teorías y modelos. Lo importante es que el gel resultante presenta un estado sólido o semisólido al inmovilizar la fase líquida dispersante del sol inicial. Las cantidades relativas de fase dispersa y dispersante que dan origen a un gel varían ampliamente (Gálvez Mariscal *et al.*, 2013).

El estudio de las propiedades gelificantes es muy importante debido a que la formación de un gel proteico está vinculada con características típicas de los alimentos como textura, propiedades organolépticas, rendimiento y calidad de los productos como quesos, yogurt, tofu, salsas, aderezos, postres, gelatina, embutidos (Pilosof, 2000b). La capacidad de gelificación es uno de los factores más importantes tanto en la elaboración de

nuevos productos como en la obtención de productos análogos a otros, por ejemplo sustitutos de la carne, símil lácteos, sucedáneos del huevo. La gelificación no solo se utiliza para formar geles sólidos viscoelásticos, sino también para mejorar la absorción de agua, los efectos espesantes, la fijación de partículas (adhesión), y para estabilizar emulsiones y espumas (Damodaran, 2010). Los biopolímeros espesantes como los hidrocoloides polisacáridos son ampliamente usados, ya que son efectivos en bajas concentraciones y no contribuyen significativamente al sabor, color ni valor nutricional (Balny y Masson, 1993; Rogers, 1999). Una utilidad de las proteínas como agentes espesantes o gelificantes, a diferencia de los hidrocoloides polisacáridos, sería aportar valor nutricional, y a la vez probablemente color y *flavor*, por lo que su estudio y caracterización revisten intereses variados.

En algunos casos generar un gel alimentario tiene como propósito otorgar o mejorar características organolépticas a un producto determinado como reemplazar grasas, hacerlo más homogéneo, mejorar la retención de agua, estabilizar emulsiones y espumas (Cheftel *et al.*, 1989). En otros casos el propósito puede ser vehiculizar un componente bioactivo encapsulado o protegido (Hugo *et al.*, 2014). El objetivo también puede ser mejorar el valor nutricional por aumento del contenido de proteínas. Cuando las proteínas se asocian entre ellas, el líquido viscoso se transforma en una matriz viscoelástica. Sin embargo, debido a que los geles pueden presentar un comportamiento “*soft*” por el cual se rompen y fluyen bajo la aplicación de fuerzas muy pequeñas, una definición estricta es muy difícil y es por esto que se utilizan los términos “fuertes” o “débiles” para una subclasificación de los geles (Clark y Ross-Murphy, 1978; Poulos, 2000b).

Por lo antedicho, puede haber situaciones en que sea conveniente formar un gel con bajo contenido proteico (para dietas hipocalóricas o donde se quiera no enmascarar otro rasgo organoléptico) o con alto contenido proteico (como suplemento para deportistas, para desnutridos o embarazadas). De esta manera resulta interesante conocer el efecto de la concentración proteica en las características de los geles, ya que daría información de interés tecnológico además de conocimiento básico sobre la capacidad de las proteínas para esta propiedad funcional.

8. Tratamientos para inducir la gelificación proteica

Un sol puede transformarse en gel por medio de mecanismos físicos y químicos. Los agentes físicos pueden ser energía térmica o altas presiones, mientras que los agentes

químicos que se pueden incorporar para inducir la gelificación pueden ser iones como el calcio, sales, enzimas, entre otros (Totosaus *et al.*, 2002).

El TT es un procedimiento habitual para lograr la gelificación, ya que desnaturaliza las proteínas y permite la interacción entre las moléculas. La secuencia de fenómenos involucrados en la transformación por calentamiento de una solución proteica a un gel puede ocurrir en varias etapas. Una primera etapa en la cual las proteínas se desnaturalizan por el calor y una segunda etapa donde las moléculas proteicas interactúan entre sí (Foegeding *et al.*, 1995). En un cierto tiempo se llega al “punto gel” donde las interacciones son suficientes para formar una matriz con características viscoelásticas. Estas características pueden ir cambiando con el tiempo y el enfriamiento hasta formar la matriz de equilibrio es decir la estructura final del gel. Parámetros como temperatura, tiempo de tratamiento y velocidades de calentamiento y de enfriamiento influyen en el proceso de gelificación térmica, y en las propiedades del gel formado. Arntfield y Murray (1992) sostienen que la velocidad de calentamiento afecta las propiedades de un gel en ciertas proteínas pero no en otras, por lo que sería necesario investigar en cada sistema el efecto de estos factores. Las características propias de las proteínas como propiedades térmicas, composición, estructura inicial de las mismas y medio donde se encuentran, también influyen en el proceso térmico de gelificación.

La gelificación también puede lograrse por mecanismos no térmicos, proceso conocido como “gelificación en frío”, a partir de proteínas previamente desnaturalizadas, aplicando tratamientos desnaturalizantes a concentración proteica menor a la concentración crítica de gelificación y posterior cambio en el medio (cambio de pH cercano al punto isoeléctrico, incorporación de calcio o magnesio, etc.). Este procedimiento en dos pasos permite incorporar, durante la gelificación, materiales que podrían destruirse o inactivarse durante la desnaturalización térmica (vitaminas, sustancias que aportan aroma o sabor, microorganismos) (Remondetto *et al.*, 2002; Maltais *et al.*, 2005 y Hugo *et al.*, 2014).

Es posible también gelificar proteínas en frío en un solo paso aplicando TAPH, pero generalmente se requieren concentraciones proteicas mayores a las necesarias para gelificar con TT y dependen del nivel de presión aplicado. Okamoto *et al.*, (1990) obtuvo geles auto-portantes de diferentes proteínas al aplicar 30 min de TAPH a diferentes niveles de presión según el tipo de proteína: 600 y 400 MPa para clara y yema de huevo respectivamente, 200 MPa para geles de actomiosina y carne de conejo, y 300 MPa para una dispersión al 16,7% p/v de proteínas de soja. Estos autores reportaron que los geles inducidos por la presión mantenían el color y sabor original y eran más blandos que los

geles obtenidos por calor. Molina *et al.* (2002) trabajaron con dispersiones de aislado proteico de soja y de sus principales globulinas al 20% de concentración de proteína, obteniendo geles auto-portantes a presiones entre 300-700 MPa. Los geles inducidos por APH dieron valores significativamente menores de adhesividad y dureza cuando se compararon con los geles térmicos. En dispersiones de concentrados proteicos de soja tanto la concentración proteica como el nivel de presión utilizado fueron claves para obtener dispersiones con mayor componente elástico que viscoso, necesitando presiones mayores a 300 MPa para dispersiones al 10% y 250 MPa en dispersiones al 15% (Alvarez *et al.*, 2008).

Los cationes divalentes, como Ca^{2+} , también pueden inducir la formación de geles proteicos o bien modificar el proceso de gelificación de las proteínas. Estos iones forman enlaces cruzados entre grupos negativamente cargados de las moléculas de proteína (Damodaran, 2010). Un buen ejemplo de este tipo de gel es el tofu, que se fabrica con las proteínas de soja. La incorporación de calcio a alimentos basados en ingredientes de origen vegetal es importante desde los puntos de vista nutricional y funcional. Por una parte, el enriquecimiento en calcio es importante en dietas vegetarianas, veganas o con restricciones de lácteos. Por otra parte, el calcio interactúa con las proteínas modificando sus propiedades funcionales porque promueve la agregación proteica a través de puentes iónicos. En el caso de los geles proteicos, las interacciones atractivas promovidas por el ion calcio entre polipéptidos pueden afectar la estructura de un gel, aumentando su dureza o carácter elástico (Scilingo y Añón, 2004; Speroni *et al.*, 2010b). Sin embargo, dado que la calidad de un gel depende del balance entre fuerzas atractivas y repulsivas, el calcio puede promover la formación de geles agregados, en los que predominen las interacciones proteína-proteína, y deteriorar ciertas características pudiendo afectar negativamente la retención de agua (Kroll, 1984; Myers, 1990).

Por lo antes mencionado, un buen manejo de la propiedad de gelificación de las proteínas requiere el estudio de las condiciones en las que se lleva a cabo el proceso de gelificación y además, de las características finales que resultan en el gel obtenido.

9. Hipótesis

Teniendo en cuenta las características estructurales de las proteínas presentes en las semillas de caupí (principalmente globulinas), se postula que éstas serán capaces de desnaturalizarse exponiendo sitios activos con posibilidad de interactuar entre ellas. De esta manera los APC presentarían buena capacidad gelificante.

La caracterización estructural y fisicoquímica de las proteínas de los APC, en estado nativo o modificadas por distintos tratamientos como los TT o TAPH permitirá explicar el proceso de gelificación de las mismas. El análisis de las interacciones entre los diferentes polipéptidos en distintas condiciones permitirá optimizar la obtención de los geles ajustando sus principales características y propiedades. De esta manera estas proteínas podrían ser incorporadas como ingredientes funcionales para uso alimentario con características de gelificación definidas.

10. Probables impactos y aportes de resultados

En base a las características mencionadas, las semillas de caupí constituyen una fuente alimentaria alternativa interesante para el consumo humano, no sólo bajo la forma de grano entero o de harina, sino también como proteínas aisladas, alternativas o complementarias de las usadas habitualmente en la formulación de alimentos.

La preparación de aislados cuya capacidad de gelificación sea conocida constituirá el paso preliminar para el diseño racional de ingredientes proteicos con funcionalidad específica en la formulación de alimentos. La posibilidad de obtener geles en frío, desnaturalizando las proteínas con APH contribuirá al uso del APC como ingredientes funcionales interesantes. De obtenerse resultados positivos estos podrían ser transferidos al sector productivo, previo análisis de su factibilidad económica.

Los resultados obtenidos complementarían al conocimiento básico existente tanto sobre proteínas de caupí como sobre los mecanismos de gelificación y propiedades de los geles proteicos obtenidos a partir de proteínas desnaturalizadas por calor o APH.

Objetivos



1. General

Si bien existen antecedentes sobre las propiedades funcionales de APC, no hay estudios que profundicen en los mecanismos de los resultados obtenidos. Se cuenta solamente con datos comparativos que surgen de la medición de una propiedad dada. Así mismo, hay escasos reportes sobre las modificaciones en las propiedades funcionales de APC a causa de tratamientos físicos y químicos utilizados habitualmente en la industria alimentaria.

Por ello se propuso como objetivo general estudiar en profundidad la capacidad de gelificación de APC bajo distintas condiciones, de manera de obtener información que permita incorporar estas proteínas de alto valor nutricional en alimentos destinados al consumo humano.

2. Específicos

- Evaluar los efectos de diferentes tratamientos que pueden modificar la estructura proteica ya sea durante la obtención de los APC (variando el pH de extracción), como a través de otros procedimientos aplicados sobre los APC (TT y TAPH).
- Establecer relaciones entre las propiedades fisicoquímicas de las proteínas de los APC y sus propiedades funcionales.
- Determinar parámetros críticos y factores que influyen en el proceso térmico de gelificación de los APC.
- Evaluar el efecto de pre-tratamientos con APH, y de la incorporación de calcio en el proceso térmico de gelificación de los APC.
- Estudiar la gelificación de los APC por tratamiento con APH, como alternativa a la gelificación térmica, y comparar las características de los geles obtenidos por ambos procesos.
- Evaluar el efecto de la incorporación de calcio en las características de geles obtenidos por TT o TAPH.

Materiales y Métodos



1. Preparación de la harina

La harina se preparó a partir de semillas de caupí, variedad cuarentón obtenidas de la Estación Experimental El Sombrero, Corrientes (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-INTA). Las semillas fueron molidas en un molinillo Braun (KSM2 *coffee grinder*, México) y pasadas por un tamiz con aberturas de 177 μm (ASTM 80). Posteriormente la harina fue desgrasada con hexano (relación hexano:harina 10:1), agitando la dispersión durante 24 h a 4 °C, luego se filtró y eliminó el exceso de hexano por evaporación a temperatura ambiente.

2. Preparación de APC

Los APC se prepararon según el método de Qi *et al.* (1997). Se prepararon dispersiones al 10% p/v de harina desgrasada en agua destilada y se llevaron al pH de extracción (8,0 o 10,0) con NaOH 2 N. Las dispersiones se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente con control periódico del pH y luego se centrifugaron a 10000 xg por 30 min a 20 °C (HeRMEL, modelo Z326K, Alemania). Los sobrenadantes se ajustaron a pH 4,5 con HCl 2 N, se agitaron por 2 h a 4 °C y luego se centrifugaron a 10000 xg por 20 min a 5 °C. El *pellet* se resuspendió en agua y se llevó a pH 7,0 con NaOH 2 N, luego se liofilizó y almacenó a 4 °C hasta su uso. Los aislados obtenidos se llamaron A8 y A10 según el pH de extracción proteica.

2.1. Cálculo del rendimiento en peso y de proteínas totales

Se calculó el rendimiento en peso del proceso de obtención de los aislados, como el porcentaje en peso del aislado obtenido en relación al peso de harina inicial. Además, se calculó el porcentaje del rendimiento de extracción de proteínas totales. Obteniendo el contenido total de proteínas en la harina y en los aislados obtenidos.

$$\text{Rendimiento en peso} = \text{peso de aislado} / \text{peso de harina} \times 100 \quad (\text{ec. 1})$$

$$\text{Rendimiento de proteína} = \text{proteínas en aislado} / \text{proteínas en harina} \times 100 \quad (\text{ec. 2})$$

3. Composición centesimal

La composición química de la harina y de los aislados A8 y A10 fue determinada mediante técnicas recomendadas por la AOAC, Official Methods of Analysis (1990).

3.1. Contenido de proteínas

El contenido de proteínas de la harina y los aislados, se determinó mediante microKjeldhal, el factor de conversión utilizado fue 6,25 g de proteína/g de nitrógeno.

3.2. Humedad

La humedad se determinó por diferencia de pesada, calentando 1g de muestra en estufa a 105 °C hasta peso constante.

3.3. Cenizas

El contenido de cenizas totales se evaluó calentando la muestra en mechero hasta la desaparición de humos blancos, luego se dejó en la mufla durante 3 horas a 550 °C y posteriormente se pesó.

3.4. Hidratos de carbono

Para la determinación del contenido de hidratos de carbono se utilizó el método colorimétrico de la antrona (Rose *et al.*, 1991). Se utilizó una curva patrón obtenida con solución de dextrosa. Las absorbancias se midieron a 625 nm.

4. Dispersiones proteicas de APC

4.1. Dispersiones acuosas al 1% p/p de proteínas

La masa necesaria de aislado liofilizado y agua destilada se pesaron en vaso de precipitado y se mezclaron en agitador magnético a temperatura ambiente por 30 min. Estas dispersiones fueron sometidas a los TT o TAPH, se liofilizaron y se conservaron en

frascos herméticos a 4 °C hasta su análisis. A partir de ellas se evaluaron posteriormente las propiedades fisicoquímicas y funcionales de los APC. Resultados y discusión son presentados en el Capítulo I.

4.2. Dispersiones acuosas a diferentes concentraciones

Se prepararon dispersiones de los APC al 5,5; 7,5; 9,0; 10,5; 12,0 y 13,5% p/p. Las masas necesarias de aislado liofilizado y agua destilada se pesaron en vaso de precipitado y se mezclaron en agitador magnético a temperatura ambiente por 30 min. Estas dispersiones se emplearon para estudiar el proceso de gelificación térmica de ambos APC, presentado en el Capítulo II y la caracterización de dispersiones proteicas de A10 tratadas con TT y TAPH, presentada en el Capítulo III.

4.3. Dispersiones acuosas a diferentes concentraciones con incorporación de calcio

Se prepararon dispersiones acuosas de A8 y A10 como se mencionó en Sección 4.2., a las cuales se les incorporó calcio a partir de una solución madre de CaCl_2 1 M, en una relación 2 mM de CaCl_2 / % p/p de proteína, por ejemplo: a una dispersión de 7,5% p/p de proteína se incorporó 15 mM de CaCl_2 . El volumen de solución madre de CaCl_2 necesario fue incorporado con agitación continua de la dispersión proteica, luego se continuó agitando por 30 min a temperatura ambiente obteniendo así una dispersión proteica con calcio homogénea. Estas dispersiones se utilizaron para estudiar el efecto de la incorporación de calcio en el proceso térmico de gelificación de los APC presentado en el Capítulo II.

4.4. Dispersiones acuosas de A10 con diferentes concentraciones de calcio

Para estudiar el efecto de la concentración de calcio incorporada, se trabajó con dispersiones proteicas al 7,5% p/p a las que se le incorporó calcio en concentraciones de 10, 15, 20, 30 y 40 mM. La incorporación de la solución de CaCl_2 1 M se realizó con agitación constante a alta velocidad seguida de agitación moderada constante por 30 min a temperatura ambiente. Los resultados correspondientes se describieron en el Capítulo III.

5. Tratamientos de las dispersiones proteicas

5.1. Tratamientos térmicos a dispersiones diluidas

Dispersiones acuosas (1% p/p) de A8 y A10 (Sección 4.1.) se trataron a 70 o 90 °C durante 5, 10 o 30 min, en baño maría termostatzado con agitación lenta. Se controló el tiempo y la temperatura de las dispersiones con una termocupla con sensibilidad ± 1 °C (Tes-1317R, IDT DATOS termómetro registrador, Taiwán). Al finalizar el TT se enfriaron rápidamente en baño de hielo hasta temperatura ambiente. Las muestras se liofilizaron y se almacenaron en recipientes herméticos a 4 °C hasta su análisis.

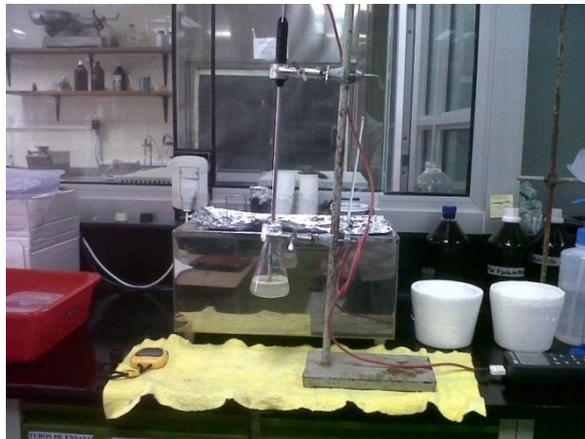


Figura 1: TT a dispersiones proteicas diluidas.

5.2. Tratamientos con alta presión hidrostática a dispersiones diluidas

Dispersiones acuosas (1% p/p) de A8 y A10 (Sección 4.1.) se sometieron a 200, 400 o 600 \pm 5 MPa durante 5 min en un sistema de altas presiones hidrostáticas (APH) (Stansted Fluid Power Ltd. Modelo de FPG 9400: 922, Stansted, Reino Unido). La temperatura inicial de los tratamientos fue 20 °C, el aumento de temperatura debido al desarrollo de calor por la compresión fue en promedio de 2,2 °C cada 100 MPa. Una mezcla de propilenglicol y agua (30:70) fue utilizada como fluido de compresión. Las dispersiones de APC se colocaron en frascos de polietileno apropiados para APH recubiertos con bolsas selladas al vacío. Las muestras tratadas se liofilizaron y se conservaron en recipientes herméticos a 4 °C hasta su análisis.



Figura 2: TAPH a dispersiones diluidas. **a)** Sistema de APH disponible en el Instituto Tecnología de Alimentos de INTA Castelar, Hurlingham, Argentina. **b)** Dispersiones proteicas diluidas de APC sometidas a APH.

5.3. Tratamientos térmicos a dispersiones concentradas

Dispersiones acuosas (7,5; 9,0; 10,5; 12,0 y 13,5% p/p) (Secciones 4.2. y 4.3.) y dispersiones al 7,5% p/p con incorporación de calcio (de 10 a 40 mM) de A10 (Sección 4.4.), se colocaron en tubos de vidrios de 15 mm de diámetro, cerrados en los extremos con tapones de goma desmontables (Figura 3a), para obtener geles proteicos en forma de cilindro, se trataron a 70 o 90 °C durante 20 min, en baño maría termostatzado. Se controló el tiempo y la temperatura de las dispersiones con una termocupla de sensibilidad ± 1 °C (Tes-1317R, IDT DATOS termómetro registrador, Taiwán). Al finalizar el TT se enfriaron rápidamente bajo corriente de agua fría hasta temperatura ambiente. Las dispersiones proteicas se almacenaron en los mismos tubos de vidrio a 4 °C durante 12 h hasta su análisis.

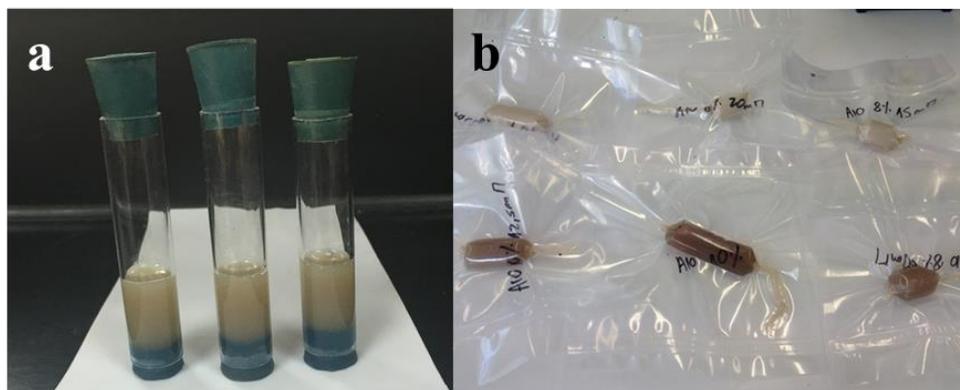


Figura 3: **a)** Tubos de vidrio con tapones desmontables con dispersiones proteicas de A10 para obtener geles por TT. **b)** Bolsas cilíndricas de membrana de celulosa con dispersiones proteicas de A10 en bolsas de cerradas al vacío para obtener geles por APH.

5.4. Tratamientos con alta presión hidrostática a dispersiones concentradas

Dispersiones acuosas (7,5; 9,0; 10,5; 12,0 y 13,5% p/p) (Secciones 4.2. y 4.3.) y dispersiones al 7,5% p/p con incorporación de calcio (de 10 a 40 mM) de A10 (Sección 4.4.), se sometieron a 400 o 600 ± 5 MPa durante 5 min en una unidad piloto de APH de 3 L de capacidad (ACB, Nantes, Francia) utilizando agua como fluido de compresión y equipada con un sistema de refrigeración y regulación de la temperatura (Julabo, Seelbach, Alemania). La temperatura durante todo el proceso fue de 20 ± 3 ° C. Las dispersiones proteicas se colocaron en bolsas de poliamida/polietileno (La Bovida, Paris, Francia) cerradas al vacío apropiadas para APH. Para formar geles de A10 con forma de cilindro semejante a los obtenidos en tubos de vidrios por TT, se utilizaron bolsas cilíndricas de membrana de celulosa (Sigma – Aldrich D9777-100FT), las cuales luego de cerradas se colocaron en las bolsas de poliamida-polietileno cerradas al vacío (Figura 3b). Las dispersiones proteicas tratadas se almacenaron en las mismas bolsas a 4 °C durante 12 h hasta su análisis.

6. Efecto de TT y TAPH sobre propiedades fisicoquímicas y funcionales

El efecto de los TT (Sección 5.1.) y TAPH (Sección 5.2.) sobre las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas de los APC se estudiaron realizando las determinaciones que se describen en esta Sección sobre las muestras liofilizadas de A8 y A10, tratadas y no tratadas.

6.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

Se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) según lo descrito por Laemmli (1970) usando geles separadores (acrilamida-bisacrilamida 12,0% en *buffer* de gel separador, pH = 8,8) y geles concentradores (acrilamida-bisacrilamida 4,0% en *buffer* de gel concentrados, pH 6,8). Las muestras liofilizadas (1 mg de proteína/mL) se dispersaron en *buffer* de muestra (pH 6,8). Para obtener condiciones reductoras se agregó 5% de 2-mercaptoetanol (2-ME) a dicho *buffer* y se calentó un min en baño a ebullición. Las corridas se realizaron con *buffer* de corrida (pH 8,3) a una corriente constante de 30 mA por gel durante aproximadamente 45

min (Equipo de cuba electroforética (BIO-RAD, Miniprotean Tetra Cell). La composición de las soluciones empleadas se detalla en el Apéndice I.

Se utilizaron patrones de peso molecular: β -fosforilasa (94 kDa); albúmina de suero bovino (67 kDa); ovoalbúmina (45 kDa); anhidrasa carbónica (30 kDa); inhibidor de tripsina (20,1 kDa); β -lactoalbúmina (14,4 kDa) (LWM - Pharmacia).

Los geles obtenidos por las técnicas de electroforesis fueron fijados y teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0,1% en agua:metanol:ácido acético (10:10:4), durante 12 horas; y desteñidos con una solución acuosa de metanol 25,0% p/v y ácido acético 10,0% p/v.

6.2. Espectroscopía de absorción en el UV

Se prepararon dispersiones acuosas al 0,1% p/p pesando la cantidad de muestra liofilizada y agua destilada necesarias, seguido de agitación constante por 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 10000 xg por 30 min a 20 °C y se determinaron los espectros de absorción en el UV del sobrenadante. Se utilizó un espectrofotómetro Metrolab 1700 UV-visible y celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Se registraron las absorbancias desde 400 a 200 nm, con intervalos de 1 nm y velocidad de escaneo de 300 nm/min. Las absorbancias se expresaron por mg de proteína determinando la cantidad de proteína en el sobrenadante por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

6.3. Espectroscopía de emisión de fluorescencia

Dispersiones de las muestras al 0,1% p/p de proteína en *buffer* Tris-HCl 0,05 M pH 7,5 se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10000 xg por 30 min a 20 °C. La fluorescencia intrínseca de las muestras se determinó con un espectrofotómetro Perkin-Elmer LS 50B (Watham-MA, EE.UU.) a una longitud de onda de excitación de 280 nm (ranura de excitación de 5 nm) y de emisión 300 - 450 nm (ranura de emisión de 5 nm) utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Registrando los espectros de emisión cada 0,5 nm a una velocidad de escaneo a 300 nm/min. La intensidad de fluorescencia emitida se normalizó con la cantidad de proteína, determinando la concentración proteica en el sobrenadante con el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

6.4. Hidrofobicidad superficial

La hidrofobicidad superficial (H_o) se determinó con el método de Cardamone y Puri (1992). Como sonda de fluorescencia se utilizó 1,8-anilina naftaleno-sulfonato (ANS) (Aldrich Chemical Co., Milwaukee-Wisconsin, EE.UU.). El espectro de emisión fue determinado entre 370 a 600 nm, en dispersiones de 0,020-0,030 mg/mL de proteína que se obtuvieron por dilución de una solución madre (0,1% p/p de proteína) en *buffer* Tris-HCl 0,05 M pH 7,5, las cuales se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10000 xg por 30 min a 20 °C. Se obtuvieron los espectros de emisión a diferentes concentraciones de ANS (de 0 a 100 μ M), los espectros se corrigieron sustrayendo el blanco (solución de cada concentración de ANS en el mismo *buffer*), y se determinó el aumento de la intensidad de fluorescencia emitida (ΔIF) por la unión proteína-ANS. El ΔIF a la longitud de onda de máxima emisión de fluorescencia (470 nm) fue graficado en función a la concentración de ANS, y la curva se ajustó a la siguiente ecuación:

$$\Delta IF = \frac{A \times ANS}{B + ANS} \quad (\text{ec.3})$$

Donde el coeficiente $A = \Delta IF_{\max}$ es el cambio de intensidad de fluorescencia en la saturación de ANS. La H_o es proporcional a ΔIF_{\max} por mg de proteína, por lo tanto se calcula dividiendo el coeficiente A estimado de la ecuación 3 por los mg de proteína determinados en la dispersión proteica por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

6.5. Propiedades térmicas. Calorimetría Diferencial de Barrido

Se utilizó un calorímetro diferencial de barrido Perkin-Elmer Pyris-1 (Waltham, MA, EE.UU.). Se prepararon dispersiones acuosas de aislados (15,0% p/p) en cápsulas de aluminio herméticamente selladas que contenían entre 15 y 20 mg de dispersión. Las temperaturas de desnaturalización, T_d (°C), y la entalpía de transición, ΔH (J/g de proteína), se obtuvieron mediante el análisis de los termogramas con el software OriginPro8. La T_d fue la temperatura del máximo de la transición endotérmica, y el ΔH se calculó como el área correspondiente a la transición endotérmica. Dicha área se obtuvo trazando una línea de base recta uniendo el comienzo y la finalización de la transición

térmica e integrando el flujo de calor en función del tiempo. El grado de desnaturalización fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de desnaturalización (GD, \%)} = 100 - \Delta H_t / \Delta H_o \times 100 \quad (\text{ec.4})$$

donde ΔH_o es la entalpía de la muestra sin tratar y ΔH_t es la entalpía de la muestra tratada.

6.6. Solubilidad

La Solubilidad (S_o) de las proteínas se midió en dispersiones acuosas de 0,1% (p/p) mediante el método de Bera y Mukherjee (1989). Se prepararon las dispersiones necesarias a partir de aislados liofilizados y agua destilada, seguido de agitación constante por 30 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10000 xg por 30 min a 20 °C. La S_o se expresó como la relación porcentual entre la proteína soluble en los sobrenadantes determinada por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) utilizando seroalbumina bovina como patrón y el contenido proteico total de las muestras liofilizadas determinado por el método de microKjeldhal (AOAC, 1990).

6.7. Capacidad de retención de agua

Se prepararon dispersiones acuosas (pH 7,0) al 10,0% p/v de proteína de las muestras liofilizadas, utilizando un vórtex y manteniendo en agitación por 30 min a temperatura ambiente. Luego las muestras fueron centrifugadas a 10000 xg por 20 min a 20 °C. Se recogió el total del sobrenadante, midiendo el volumen y se determinó la concentración de proteína soluble (Lowry *et al.*, 1951). La capacidad de retención de agua (WHC) expresada como g agua/ g muestra, se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{WHC} = m_2 - (m_1 - m_3) / m_1 \times \delta \quad (\text{ec. 5})$$

Donde m_1 es la masa inicial de aislado (g), m_2 es el peso del sedimento (g) y m_3 es la cantidad de proteína soluble determinada en el sobrenadante (g), δ es la densidad del agua (1 g/mL).

6.8. Viscosidad aparente

Se determinó la viscosidad aparente (η^*) a 20 °C de dispersiones acuosas al 10,0% p/v de las muestras liofilizadas. Se pesó la cantidad de aislado necesario y se llevó a volumen, las dispersiones se mezclaron por 30 min en agitadores magnéticos a temperatura ambiente. El ensayo de viscosidad se realizó en un Reometro HAAKE (RheoStress modelo 6000, Thermo Electron Corporation, Alemania, 2004) utilizando una sonda de platos paralelos (sonda PP35) con 1 mm de separación, termostatazando la muestra a 20 °C, y finalmente aplicando una velocidad de deformación de 500 s⁻¹. La viscosidad aparente se expresó en cP y se obtuvo mediante análisis de los datos con el software Rheo Win 3.30.

6.9. Concentración mínima de gelificación

La concentración mínima de gelificación (LGC) se determinó mediante el método de Coffmann y García (1977) con algunas modificaciones. Dispersiones acuosas de las muestras liofilizadas de concentraciones entre 6,0 y 16,0% p/p (incrementando de a 2,0% p/p) fueron preparadas en tubos eppendorf en un volumen final de 1 mL. Las dispersiones fueron calentadas en un baño de agua hirviendo por 30 min, seguido de enfriamiento bajo corriente de agua fría hasta temperatura ambiente y luego refrigeración a 4 °C durante 4 h. La LGC se determinó como la mínima concentración ensayada a la cual al invertir el tubo la dispersión proteica no resbalaba por las paredes. Las dispersiones se desmoldaron y se determinó visualmente su consistencia, clasificando como (-) líquida, (±) viscosa, (+) gel, (+ +) gel firme y (+ + +) gel muy firme.

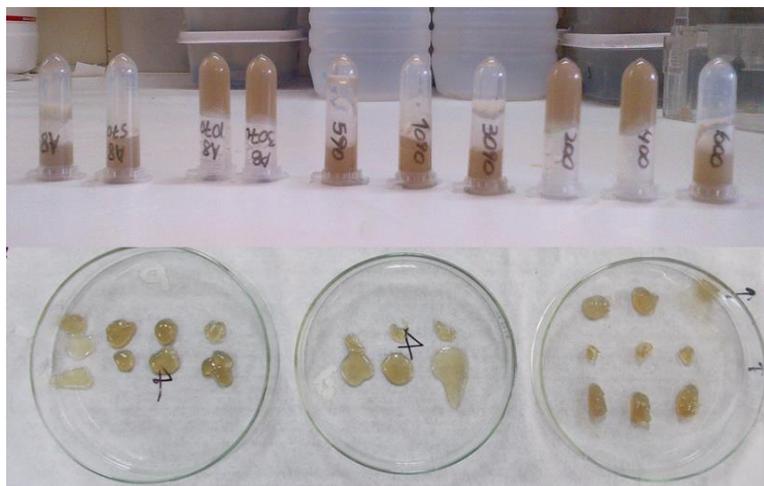


Figura 4: Determinación de la LGC y consistencia de dispersiones proteicas de APC.

7. Efectos *in situ* de las APH

Las medidas se realizaron al aumentar gradualmente la presión (etapa de compresión), y al disminuirla (etapa de descompresión). Por disponibilidad y características del equipamiento utilizado, se trabajó con un solo aislado (A10) y el nivel de presión máximo alcanzado fue 450 MPa en el espectrofotómetro y 600 MPa en el espectrofluorómetro. La concentración adecuada de las dispersiones proteicas para la medición de la señal en los equipos fue de 0,3 a 0,4 mg/ mL de proteína (0,05% p/p). Se prepararon dispersiones de A10 al 0,05% p/p en *buffer* TRIS – HCl 50 mM (pH 7,5), se pesó la cantidad de aislado y *buffer* necesario y se dejaron agitando a 4 °C durante toda la noche para total hidratación de las muestras. Las dispersiones se centrifugaron 10 min a 10000 xg a 20 °C y se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante utilizando el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

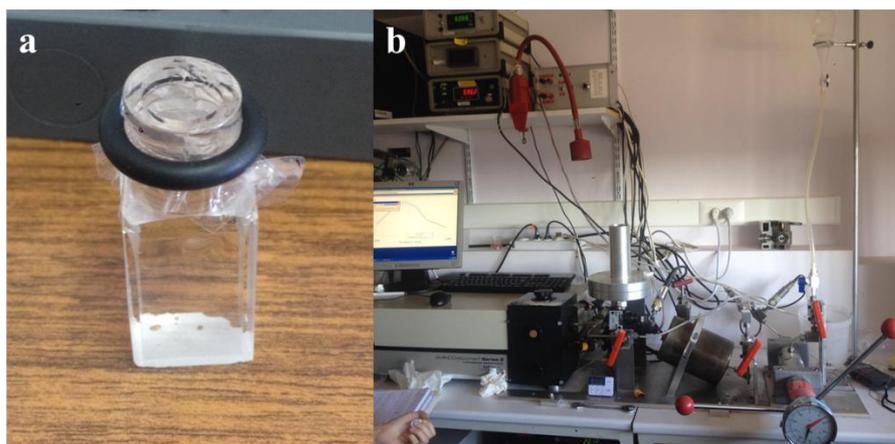


Figura 5: a) Cubeta de cuarzo para contener las dispersiones proteicas sometidas a APH. b) Espectrofluorómetro equipado con una celda adecuada y bomba manual de APH. (Instituto Nacional de la Salud y de la Investigación Médica (INSERM), Montpellier, Francia).

7.1. Espectroscopia de absorción en el UV bajo APH

Los espectros de absorción se obtuvieron en un espectrofotómetro UV – visible Cary 3E (Varian) equipado con una celda de APH termostatzada en el compartimiento de la muestra (Lange *et al.* 1996a). La presión de la celda se aumentó o disminuyó con una bomba manual (500 MPa, Nova Swiss, Cesson, Francia) usando agua desionizada como medio transmisor de la presión, el límite máximo alcanzado fue de 450 MPa. Las dispersiones proteicas se colocaron en una cubeta de cuarzo de 2 mL de capacidad

herméticamente cerrada con un film de polietileno (4" DuraSeal™ de PolyLabo Paul Block, Estrasburgo, Francia) sujeto por un anillo de goma para permitir la transmisión de las APH (Figura 5a). Las muestras se equilibraron 2 min a cada presión elegida y 20 °C determinando el espectro de absorción de 350 a 250 nm, con un intervalo cada 0,1 nm y velocidad de escaneo de 60 nm/min. La línea de base fue determinada con el *buffer* utilizado en la dispersión proteica a 10 MPa, tomando la misma como presión de inicio del TAPH.

Los datos se analizaron a través de las cuartas derivadas de la absorbancia en función de la longitud de onda, calculadas por el método del cambio espectral propuesto por Butler (1979) y modificado por Lange *et al.* (1996a) utilizando el programa SigmaPlot. Se registraron también las absorbancias a 350 nm directamente de los espectros de absorción.

7.2. Espectroscopía de fluorescencia bajo APH

Los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron en un espectrofluorómetro Aminco Bowman – Serie 2, SLM Co (Rochester, Estados Unidos) equipado con una celda apta para APH fabricada de acero especial (Marval X12) y ventanas de zafiro (Lange *et al.*, 1996a). La presión de la celda se aumentó o disminuyó con una bomba manual (700 MPa, Nova Swiss, Cesson, Francia) (Figura 5b) usando agua desionizada como medio transmisor de la presión. Las dispersiones proteicas se colocaron en una cubeta de cuarzo cilíndrica de 600 µL de capacidad y 0,5 cm de diámetro, herméticamente cerrada con un film de polietileno (4" DuraSeal™ de PolyLabo Paul Block, Estrasburgo, Francia) sujeto por un anillo de goma para permitir la transmisión de las APH.

Para registrar los espectros de emisión de fluorescencia se utilizó una longitud de onda de excitación de 290 nm, con ventana de 2 nm, y longitud de onda de emisión de 345 nm, con ventana de 4 nm, registrando los datos cada 1nm a una velocidad de escaneo de 240 nm/min. Los espectros de fluorescencia fueron la medida de 3 espectros sucesivos a cada presión. La presión se aumentó o disminuyó cada 50 o 100 MPa dejando estabilizar la muestra por 2 min antes del registro de los espectros. Se varió el nivel de presión máximo alcanzado en cada corrida (200, 400 o 600 MPa).

Para caracterizar los espectros de fluorescencia se calculó el centro de masa espectral (CSM) con la siguiente ecuación (Lullien-Pellerin *et al.*, 2001):

$$\text{CSM (cm}^{-1}\text{)} = \Sigma (v_i \cdot F_i) / \Sigma F_i \quad (\text{ec.6})$$

siendo v_i la longitud de onda expresada en cm^{-1} y F_i la intensidad de fluorescencias a v_i .

8. Proceso térmico de gelificación de APC. Efecto del pre-tratamiento con APH. Efecto de la incorporación de calcio

8.1. Reología dinámica de pequeña deformación

Para estudiar el proceso de gelificación térmica de APC los ensayos se realizaron en un reómetro AR1000 (TA Instruments New Castle, Del., EE.UU.), usando un sensor de geometría de cono-placa 40 mm diámetro y ángulo 4° , separación 129 μm . Con control de temperatura y rampa de calentamiento-enfriamiento a través de un sistema Peltier. El rango de viscoelasticidad lineal fue determinado a una frecuencia de 1 Hz. Luego se seleccionó una deformación de 1% que pertenecía al rango de viscoelasticidad lineal y una frecuencia de 1 Hz para realizar las mediciones de los módulos G' y G'' en función del tiempo y la temperatura. Las dispersiones proteicas se colocaron sobre el plato inferior, se aplicó silicona de baja viscosidad alrededor del borde de los platos, para prevenir la deshidratación. El ciclo térmico consistió en el calentamiento de las dispersiones desde 20 $^\circ\text{C}$ hasta la temperatura de *plateau*, a una velocidad de calentamiento determinada (1 o 20 $^\circ\text{C}/\text{min}$) (etapa de calentamiento), seguido de una etapa isotérmica de 20 min (etapa de *plateau*), para terminar con el enfriamiento hasta 20 $^\circ\text{C}$, a una velocidad de enfriamiento igual a la de calentamiento (1 o 20 $^\circ\text{C}/\text{min}$) (etapa de enfriamiento).

8.2. Variación de la concentración proteica

Se evaluaron dispersiones proteicas de los aislados A8 y A10 a diferentes concentraciones (5,5; 7,5; 9,0; 10,5; 12,0% p/p) preparadas como se describió en la Sección 4.2., sin y con pre-tratamiento con APH (Sección 5.4.) y sin y con incorporación de calcio (Sección 4.3.), aplicando un ciclo térmico (Sección 8.1.) con temperatura de *plateau* de 90 $^\circ\text{C}$ y velocidad de calentamiento y enfriamiento de 20 $^\circ\text{C}/\text{min}$, para determinar la concentración crítica de gelificación (CC) y el efecto de la concentración proteica en el comportamiento reológico.

8.3. Variación de la temperatura de *plateau*

Se evaluaron dispersiones proteicas de los aislados A8 y A10 al 10,5% p/p, preparadas como se describió en la Sección 4.2., sin y con pre-tratamiento con APH (Sección 5.4.) y sin y con incorporación de calcio (Sección 4.3.), aplicando un ciclo térmico (Sección 8.1.) con temperatura de *plateau* variable (50, 60, 70, 80, 90 o 95 °C) con velocidad de calentamiento y enfriamiento de 20 °C/min, para determinar la temperatura crítica de gelificación (TC) y el efecto de la temperatura de *plateau* en el comportamiento reológico.

8.4. Variación de la velocidad de calentamiento y enfriamiento

Se evaluaron dispersiones proteicas de los aislados A8 y A10 al 10,5% p/p, preparadas como se describió en la Sección 4.2., aplicando un ciclo térmico (Sección 8.1.) con temperatura de *plateau* de 70 o 90 °C y velocidad de calentamiento y enfriamiento de 1 °C/min, para relacionar el proceso de gelificación térmica con las propiedades térmicas (Sección 8.6.) de las proteínas de los APC. Así también se evaluó el efecto de la velocidad de calentamiento y enfriamiento (1 o 20 °C/min) sobre los parámetros del proceso de gelificación.

8.5. Parámetros empleados para caracterizar el proceso térmico de gelificación de APC:

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

tan δ : tangente del ángulo de desfase, cociente entre G'' y G' a frecuencia de 1 Hz y deformación de 1%. Se evaluó al finalizar el *plateau* (tan δ -X °C), y al finalizar la etapa de enfriamiento (tan δ -20 °C).

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

Concentración crítica de gelificación (CC (% p/p)): mínima concentración ensayada a la cual G' superó a G'' y la $\tan \delta$ fue menor a 0,3, condición evaluada tanto al finalizar el *plateau*, como al finalizar la etapa de enfriamiento.

Temperatura crítica de gelificación (TC (°C)): mínima temperatura de *plateau* ensayada, a la cual G' superó a G'' y la $\tan \delta$ fue menor a 0,3, condición evaluada tanto al finalizar el *plateau*, como al finalizar la etapa de enfriamiento.

P_{EC}: punto de entrecruzamiento: tiempo de *plateau* o temperatura de calentamiento en que G' igualó a G'' , a 1 Hz.

P_{t0,3}: punto en el cual $\tan \delta$ fue menor a 0,3: tiempo de *plateau* o temperatura de calentamiento o de enfriamiento en que la $\tan \delta$ disminuyó hasta 0,3 ($G'' = 0,3 G'$, a 1 Hz).

8.6. Calorimetría diferencial de barrido (MICRO-DSC)

Las determinaciones se realizaron en un Micro DSC III (SETARAM, Caluire, Francia). El calentamiento se realizó a una velocidad de 1 °C/min, en el rango de 20 a 100 °C. Las dispersiones proteicas (800 mg en promedio) se colocaron en celdas metálicas herméticamente cerradas, usándose como referencia una celda con agua destilada. Las temperaturas de desnaturalización, T_d (°C), la entalpía de transición, ΔH (J/g de proteína), y el grado de desnaturalización (GD %) se obtuvieron mediante el análisis de los termogramas como se describió en la Sección 6.4. Las temperaturas del proceso de desnaturalización proteica se compararon con las temperaturas de gelificación obtenidas al trabajar en el reómetro a la misma velocidad de calentamiento (1 °C/min) (Sección 8.4.). Se estudiaron dispersiones proteicas de A8 y A10 al 7,5 o 10,5% p/p, preparadas como se describió en la Sección 4.2. sin y con pre-tratamiento con APH (Sección 5.4.) y sin y con incorporación de calcio (Sección 4.3).

8.7. Determinación de la concentración del ion sodio y de la osmolaridad

Dispersiones acuosas de A8 y A10 al 10,5% p/p de proteína se utilizaron para medir el contenido de ion sodio (Na⁺ (mM)) y la osmolaridad (mOsmol/L) de las mismas. El contenido de Na⁺ se determinó con un electrodo selectivo de iones compacto

LAQUAtwin B-722, (Horiba Scientific, Kyoto, Japón). La osmolaridad se midió con un Osmómetro (Roebing, Berlin, Alemania) basado en método de la variación del punto de fusión con respecto al agua destilada.

9. Caracterización de dispersiones proteicas de A10 sometidas a TT o TAPH

En esta Sección se caracterizaron dispersiones proteicas de A10 de diferentes concentraciones (Sección 4.2.) y dispersiones al 7,5% p/p a las cuales se les incorporó diferentes concentraciones de calcio (Sección 4.3.) y se le aplicaron TT (Sección 5.3.) o TAPH (Sección 5.4.) con el fin de obtener geles proteicos. La caracterización se realizó luego 12 h de almacenamiento a 4 °C.

9.1. Reología dinámica de pequeña deformación

El rango de viscoelasticidad lineal fue determinado a 1 Hz de frecuencia. Dentro de este rango se seleccionó una deformación de 1% para los barridos de frecuencia (de 0,1 a 10 Hz) para todas las muestras. Los ensayos se realizaron en un reómetro Paar Physica MCR 300, usando un sensor de platos paralelos con una separación de 1 mm. Se usó un software US 200 V2.21 para analizar los datos. Se evaluaron los espectros mecánicos obtenidos (G' y G'' en función de la frecuencia) y los parámetros G' (elasticidad) y $\tan \delta$ (viscoelasticidad) a 1 Hz.

9.2. Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua (WHC) se ensayó por dos metodologías empleadas en la bibliografía consultada, una luego de centrifugación a alta velocidad eliminando el sobrenadante (Speroni y Añón, 2013; Hu *et al.*, 2013a y Tang *et al.*, 2011) y la otra luego de centrifugación a baja velocidad recogiendo el líquido perdido (Puppo *et al.*, 1995 y Avanza *et al.*, 2005b). Se realizaron pequeñas modificaciones para adaptarse a las muestras a estudiar.

9.2.1. WHC luego de centrifugación a altas velocidades

Se pesó 1 g de muestra, a temperatura ambiente, en tubo *ependorf* de 2 mL y se centrifugó durante 20 min a 10000 xg a temperatura ambiente. Los tubos se invirtieron para drenar el sobrenadante y el líquido residual se eliminó cuidadosamente con papel de filtro seco. La WHC fue expresada como el porcentaje de la muestra inicial que quedaba retenida luego de la centrifugación.

9.2.2 WHC luego de centrifugación a bajas velocidades

Las muestras obtenidas luego de los tratamientos descritos en las Secciones 5.3. y 5.4. se equilibraron a temperatura ambiente y se desmoldaron cuidadosamente sin perder líquido exudado sobre una membrana de Nylon (diámetro de poro 5,0 μm Micronsep) mantenida en el medio de un tubo de centrífuga de 50 mL usando como soportes tubos de acrílico. Se centrifugaron durante 5 min a 120 xg a temperatura ambiente y se recogió todo el líquido perdido en la parte inferior del dispositivo. Se determinó el peso de la muestra antes y después de centrifugar y la WHC se expresó como el porcentaje de la muestra inicial que quedaba retenida luego de la centrifugación.

9.3. Propiedades de color

Se realizaron mediciones con un colorímetro Chroma Meter CR- 300C, (MINOLTA, Osaka, Japón). La luminosidad de los geles se determinó por medio del parámetro L^* , el equilibrio entre el color verde y rojo por el valor a^* , y el equilibrio entre el amarillo y el azul por medio del valor b^* .

A partir de estos parámetros se calcularon los atributos de color (hue, H^*) e intensidad del color (chroma, C^*):

$$H^* = \text{tg}^{-1} (b^*/a^*) \text{ cuando } a^* > 0 \quad (\text{ec. 7})$$

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (\text{ec. 8})$$

Los parámetros fueron medidos en una placa de Petri de polietileno, obteniendo un espesor constante de las dispersiones y los geles (9 mm) sobre un fondo blanco. Los

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

9.4. Solubilidad en diferentes medios desnaturalizantes

Porciones de la dispersiones tratadas en una relación 1:5, se suspendieron en *buffer* salino (BS) (0,0325 M K_2HPO_4 ; 0,0026 M KH_2PO_4 ; 0,4 M NaCl, pH 8,0), con y sin el agregado de agentes desnaturalizantes: Dodecil sulfato de sodio (SDS) (BS con 10 g/L SDS); Urea (BS con 6 M urea); SDS y urea (SDS+UREA) (BS con 10 g/L SDS y 6 M urea). Las dispersiones se agitaron durante 30 min en un agitador magnético a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 10000 xg durante 20 min a 20 °C. El contenido de proteínas del sobrenadante se determinó mediante el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

9.5. Microscópica electrónica de barrido

Se tomaron muestras de los geles de 2 mm de espesor y se fijó químicamente la red proteica conservándolas durante 48 h en glutaraldehído al 2,5%. Se seccionaron porciones de 1 mm³ y se procedió a una deshidratación creciente, con acetona 25, 50, 70 y 90% a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se hicieron tres lavados de 30 minutos cada uno, con acetona 100%. Las muestras fueron luego sometidas a un secado por punto crítico, en un equipo Polaron, donde se intercambiò la acetona por CO₂ líquido. Se montaron sobre cinta doble faz. Seguidamente se recubrieron con una fina capa de oro en un equipo de evaporación de metales en plasma de Argón para minimizar los efectos de carga y para aumentar la densidad electrónica superficial (Hermansson y Langton, 1994). La observación se realizó en un microscopio de barrido JEOL 35 CF con una aceleración de voltaje 5 KV.

9.6. Perfil de textura de geles proteicos

Se realizó solo en muestras de geles auto-portantes, se cortaron cilindros de 15 mm de altura y 15 mm de diámetro. Los geles se comprimieron 20% de su altura original (Puppo y Añón, 1998b), confirmando que no ocurría fractura del material, en un analizador de textura TA-XT2i Texture Analyser, (Vienna Court, Inglaterra), con el software Texture

Export para windows 1.0. Se ensayó un test de compresión uniaxial de dos ciclos (Steffe, 1996), en platos paralelos con una sonda SMSP/75 (0.98 N) a una velocidad constante de 0,5 mm/s.

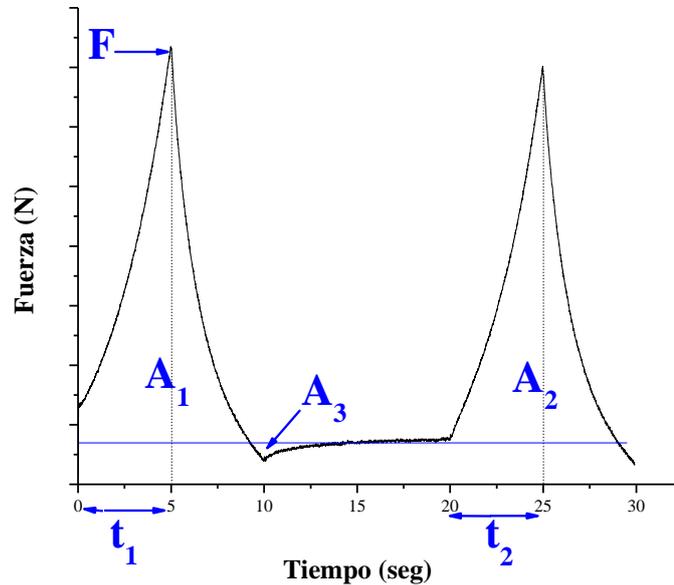


Figura 6: Curva típica del perfil de textura (Fuerza en función del tiempo). Parámetros: dureza (F); adhesividad (A_3), cohesividad (A_2/A_1) y elasticidad (t_2/t_1).

A partir de las curvas de fuerza en función del tiempo (Figura 6) se calcularon los parámetros de dureza, adhesividad, cohesividad y elasticidad de los geles utilizando el software OriginPro 8. La dureza de los geles se expresó como la fuerza aplicada para realizar la primera compresión (F), representaría la resistencia del gel. La adhesividad, es el trabajo necesario para separar la sonda de la muestra (A_3), representa la capacidad del gel de pegarse a otros materiales, se encuentra influenciada tanto por las fuerzas atractivas entre la superficie del gel y la superficie de otros materiales, como por las fuerzas dentro del gel y su capacidad de deformarse (elasticidad y viscosidad). La cohesividad (A_2/A_3), es la relación entre el trabajo realizado en cada compresión, es función directa del trabajo necesario para vencer las uniones internas del material. La elasticidad (t_2/t_1) es la habilidad para recuperar la forma original del gel, esta relacionado a la altura que el material recupera entre el final de la primera compresión y el comienzo de la segunda (Bourne, 1968, Pilosof, 2000b).

10. Análisis estadístico de los datos

Todos los tratamientos y análisis experimentales se realizaron al menos por triplicado. Se realizó un análisis factorial de la varianza (ANOVA) considerando factores como: pH de extracción (A8 o A10), tratamiento (nivel de temperatura o presión, tiempo), para el Capítulo I; pH de extracción, concentración proteica, temperatura y velocidad de calentamiento para el Capítulo II; y tratamiento, concentración proteica o concentración de calcio para el Capítulo III; incluyendo las interacciones entre ellos. Se utilizó una prueba de diferencia mínima significativa (LSD) con un intervalo de confianza de 95% para comparar las medias. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2016).

Resultados y discusión



Capítulo I:

Aislados proteicos de caupí. Efecto de TT y TAPH sobre propiedades fisicoquímicas y funcionales.

Los aislados proteicos de caupí (APC) pueden ser incorporados en la formulación de alimentos siempre que posean adecuadas propiedades funcionales. Dado que las propiedades funcionales dependen principalmente de las propiedades fisicoquímicas y estructurales de las proteínas, éstas se caracterizaron en este Capítulo a fin de obtener información que permitiera explicar o dirigir las propiedades funcionales. El tratamiento térmico (TT), uno de los procesamientos más antiguos y más usados en la industria alimentaria, y el tratamiento con altas presiones hidrostáticas (TAPH), uno de los procesamientos emergentes en las últimas décadas, modifican las propiedades estructurales de las proteínas; por tal motivo se evaluaron los efectos específicos de los mismos sobre las proteínas de los APC. Dado que el proceso de obtención de los APC puede modificar la composición o estructura de sus proteínas, se trabajó con dos APC (A8 y A10, llamados según su pH de extracción, pH 8,0 y pH 10,0 respectivamente) para evaluar los efectos de los TT y TAPH sobre dos productos de partida potencialmente distintos. La concentración proteica empleada durante los tratamientos en esta etapa del trabajo fue relativamente baja (1% p/p de proteína) para evitar una agregación masiva, coagulación o gelificación. Los TT aplicados fueron a 70 o 90 °C, variando el tiempo (5, 10 o 30 min). Los TAPH se aplicaron a 200, 400 o 600 MPa durante 5 min. Los aislados no tratados y tratados se liofilizaron y analizaron a través de SDS-PAGE, fluorescencia intrínseca, hidrofobicidad superficial y propiedades térmicas, agrupadas como propiedades fisicoquímicas; solubilidad, capacidad de retención de agua, viscosidad aparente y concentración mínima de gelificación, agrupadas como propiedades funcionales. Además, se estudió *in situ* el efecto de APH sobre la estructura terciaria de las proteínas; para ello se realizaron espectros de absorción en el UV y espectros de emisión de fluorescencia cuando las dispersiones proteicas se encontraban sometidas a APH.

1. Composición de harina y aislados proteicos de caupí

La composición centesimal de la harina desgrasada, de A8 y de A10 se presenta en la Tabla 1. Los APC mostraron un gran enriquecimiento en proteínas con respecto a la materia prima. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el contenido proteico de A8 y A10; como así tampoco en los contenidos de cenizas, humedad e hidratos de carbonos. Los valores del contenido proteico están de acuerdo con los informados por otros autores para APC (Horax *et al.*, 2004a, Mwasaru *et al.*, 1999a). Al superar el 90% p/p (b.s.) de proteínas se cumple con la denominación de aislados proteicos del Código

Alimentario Argentino (Capítulo XIX, artículo 1411). Los niveles de cenizas también fueron mayores en los aislados que en la harina, probablemente como consecuencia del uso de NaOH y HCl durante la preparación.

Tabla 1: Composición centesimal (% p/p) (b.s.) de harina desgrasada y APC (A8 y A10).

	Harina desgrasada	A8	A10
Proteínas	26,06 ± 0,71b	92,39 ± 1,98a	91,48 ± 2,20a
Hidratos de Carbono	59,28 ± 2,37a	4,23 ± 0,37b	3,94 ± 0,04b
Cenizas	4,46 ± 0,11b	5,24 ± 0,04a	5,40 ± 0,05a
Humedad	10,50 ± 0,24a	5,96 ± 0,07b	5,80 ± 0,10b

Promedios ± error estándar. Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

El rendimiento en peso de la obtención de los APC fue de $17,32 \pm 0,34$ y $18,71 \pm 0,58\%$ p/p, para A8 y A10 respectivamente, sin diferencias significativas ($p > 0,05$). Por otro lado, el rendimiento de extracción de las proteínas totales de la harina fue de $60,85 \pm 1,19$ y $65,23 \pm 2,25\%$ p/p para A8 y A10, respectivamente ($p > 0,05$). Algunas fracciones proteicas de la harina pudieron quedar insolubles en el *pellet* luego de la centrifugación a pH 8,0 o 10,0 (después de la extracción de proteínas solubles) y/o soluble en el sobrenadante de la centrifugación a pH 4,5 (después de la precipitación isoeléctrica), por lo tanto la recuperación de proteínas en los APC no fue completa. Cabe destacar que estos rendimientos están en el rango de los reportados por otros autores que utilizaron métodos de extracción semejantes (Horax *et al.*, 2004a, Mwasaru *et al.*, 1999a).

El contenido de hidratos de carbono pudo deberse a fracciones de glúcidos unidos a glicoproteínas que forman parte de las globulinas mayoritarias de las semillas de caupí (Freitas *et al.*, 2004); así como también a azúcares solubles presentes en la semilla que hubieran coprecipitado con las proteínas o bien a una pequeña porción de almidón que no se separó en el *pellet* luego de la centrifugación a pHs alcalinos. Molina *et al.*, (1976) informaron una recuperación del almidón total en el *pellet* del 84%, luego de una extracción de proteínas de caupí a pH 9,0.

2. Efecto de TT y de TAPH sobre propiedades fisicoquímicas de APC

2.1. Caracterización molecular

Los patrones electroforéticos de A8 y A10 sin tratar fueron similares, lo que sugiere que el aumento del pH de la extracción de proteínas no modificó la composición polipeptídica del APC. El cambio de pH de 8,0 a 10,0 no solubilizó diferencialmente los polipéptidos de manera detectable por SDS-PAGE. Para cada tratamiento ensayado no se detectaron diferencias en los efectos producidos en los patrones electroforéticos de A8 y A10. Debido a esto, sólo se presentan los patrones electroforéticos de A8 en la Figura 1. En condiciones no reductoras, los APC sin tratar presentaron polipéptidos de 80, 60, 56, 52 y 42 kDa. Estos polipéptidos pertenecen a la fracción de vicilina (Rangel *et al.*, 2003). Además, los APC presentaron polipéptidos de 94, 33 - 25 y 20 - 14 kDa, que corresponden a la fracción de albúminas (Vasconcelos *et al.*, 2010). No se encontraron agregados proteicos en el gel concentrador, sin embargo, se encontraron especies con peso molecular mayor a 94 kDa en el gel de resolución (Figura 1a, c, y e, flechas verdes). Bajo condiciones reductoras, se observó disminución de la intensidad de las bandas de los polipéptidos de 94, 80 y 42 kDa; sin embargo, se observó un aumento en la intensidad de la banda correspondiente a polipéptidos de 20 kDa (Figura 1b, d, y f, flechas verdes). Estos resultados indican la presencia de enlaces disulfuro en tales especies proteicas. Avanza *et al.* (2013) reportaron resultados similares en patrones electroforéticos de proteínas de las harinas de caupí del NEA, con la excepción de los agregados de peso molecular mayor a 94 kDa. Esto sugiere que dichos agregados se generaron durante la obtención de los APC, probablemente durante la etapa de extracción alcalina, ya que los pHs altos favorecen la formación de puentes disulfuro (Monahan *et al.*, 1995).

Luego del TT a 70 °C aparecieron agregados solubles que no entraron al gel concentrador ni al gel separador. Estos agregados estuvieron estabilizados por puentes disulfuro ya que no se observaron en los patrones electroforéticos obtenidos en condiciones reductoras. Se observó aumento en la intensidad de las bandas de estos agregados cuanto mayor fue el tiempo del TT (Figura 1a y b, recuadros en rojo). Con el TT a 90 °C la intensidad de las bandas de los agregados fue mayor que a 70 °C, algunas de ellas permanecieron incluso en condiciones reductoras, lo que sugiere que los enlaces disulfuro no se llegaron a romper por completo en estas condiciones (Figura 1c y d, recuadros rojos).

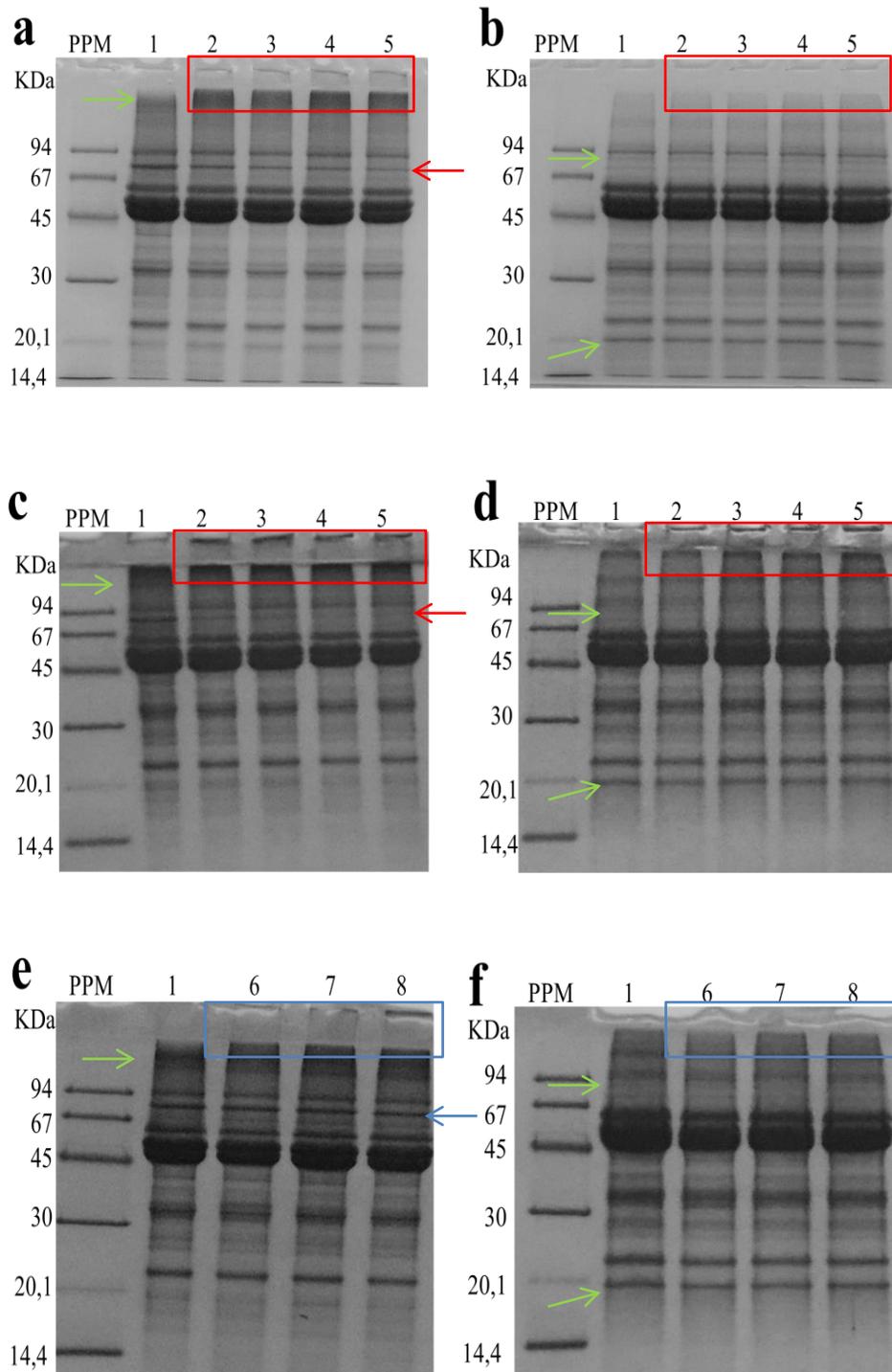


Figura 1: SDS-PAGE de A8, no tratado o sometido a TT o TAPH. a) TT a 70 °C en condiciones no reductoras; b) TT a 70 °C en condiciones reductoras; c) TT a 90 °C en condiciones no reductoras; d) TT a 90 °C en condiciones reductoras. Calle 1: A8 no tratado; calle 2: 5 min; calle 3: 10 min; calle 4: 20 min; calle 5: 30 min. e) TAPH en condiciones no reductoras; f) TAPH en condiciones reductoras. Calle 1: A8 no tratado; calle 6: 200 MPa; calle 7: 400 MPa; calle 8: 600 MPa. PPM: patrón de peso molecular. Flechas verdes: efectos relevantes en A8 sin tratar. Recuadros y flechas rojos: efectos relevantes de TT. Recuadros y flechas azules: efectos relevantes de TAPH.

Los TT, principalmente a 90 °C, provocaron la desaparición de la banda de 42 kDa y una disminución en la intensidad de la banda de 80 kDa dependiente del tiempo del TT aplicado (Figura 1a y c, flechas rojas). Lo que sugiere que estos polipéptidos correspondientes a vicilinas estuvieron involucrados en los agregados de alto peso molecular formados por los TT. La formación de agregados proteicos inducida por TT también ha sido reportada en otros aislados, como los de amaranto (Avanza y Añón, 2007) o los de soja (Petrucci y Añón, 1995).

Con los TAPH se observaron agregados estabilizados por puentes disulfuro que no ingresaron al gel separador, luego del tratamiento a 200 MPa, y agregados que no ingresaron a los geles concentrador ni separador, con los tratamientos a 400 o 600 MPa (Figura 1e y f, recuadros azules). Estos resultados sugieren que los tratamientos a 400 y 600 MPa fueron más eficaces que los de 200 MPa en la formación de agregados solubles de alto peso molecular. No se observaron variaciones en las bandas correspondientes a los polipéptidos de 80 y 42 kDa (Figura 1e, flecha azul), lo que sugiere que los agregados inducidos por las APH tuvieron una composición polipeptídica diferente a los inducidos por los TT. La agregación de proteínas inducida por APH también fue informada por Speroni *et al.* (2009) en aislados proteicos de soja y por Condés *et al.* (2012) en aislados proteicos de amaranto. Nuestros resultados indican que los fenómenos de disociación y agregación inducidos por los TT y los TAPH fueron diferentes y condujeron a la formación de diferentes especies proteicas, las cuales podrían tener diferentes propiedades funcionales.

2.2. Espectroscopía de absorción en el UV y de emisión de fluorescencia

Esta Sección se presenta en dos partes, en la primera se estudiaron los efectos de los TT y TAPH en los espectros de absorción en el UV y de emisión de fluorescencia de las muestras tratadas, liofilizadas y resuspendidas; por lo que se denominaron efectos irreversibles de los tratamientos. En la segunda parte de esta Sección, se determinaron los espectros de absorción en el UV y de emisión de fluorescencia durante la aplicación de TAPH; denominándose efectos *in situ* de las APH.

2.2.1. Efectos irreversibles de los TT y TAPH

Los aminoácidos aromáticos presentan picos de máxima absorción en la región del UV cercano, fenilalanina a 254 nm, tirosina a 274 nm y triptófano a 280 nm (Dyer, 1973). Los aislados A8 y A10 no tratados, presentaron similares longitudes de onda de máxima absorción en el UV ($\lambda_{\max\text{UV}}$) ($267,0 \pm 1,0$ y $266,0 \pm 0,1$, respectivamente ($p>0,05$)) y las absorbancias (Abs) fueron en promedio de 1,56 ($p>0,05$; Tabla 2). Los valores de $\lambda_{\max\text{UV}}$ concuerdan con la mayor proporción de fenilalanina que poseen los APC respecto a los otros aminoácidos aromáticos (Horax *et al.*, 2004a; Rangel *et al.*, 2003).

Tabla 2: Longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{\max\text{UV}}$) y absorbancia en el UV (Abs) de A8 y A10 sin tratar o sometidos a TT o TAPH.

	TT 70 °C		TT 90 °C			TAPH	
	$\lambda_{\max\text{UV}}$	Abs	$\lambda_{\max\text{UV}}$	Abs		$\lambda_{\max\text{UV}}$	Abs
A8	$267,0 \pm 1,0a$	$1,53 \pm 0,07c$	$267,0 \pm 1,0a$	$1,53 \pm 0,07b$	A8	$267,0 \pm 1,0a$	$1,53 \pm 0,07b$
5min	$264,5 \pm 0,5b$	$1,66 \pm 0,06b$	$266,0 \pm 1,0ab$	$1,64 \pm 0,04ab$	200MPa	$266,5 \pm 0,5ab$	$1,59 \pm 0,01ab$
10min	$265,5 \pm 0,5ab$	$1,70 \pm 0,08ab$	$266,5 \pm 0,5ab$	$1,72 \pm 0,01a$	400MPa	$266,5 \pm 1,5ab$	$1,54 \pm 0,02b$
30min	$265,5 \pm 0,5ab$	$1,83 \pm 0,06a$	$267,5 \pm 0,5a$	$1,77 \pm 0,03a$	600MPa	$266,0 \pm 1,0ab$	$1,56 \pm 0,04b$
A10	$266,0 \pm 0,1ab$	$1,59 \pm 0,06c$	$266,0 \pm 0,1ab$	$1,59 \pm 0,06b$	A10	$266,0 \pm 0,1ab$	$1,59 \pm 0,06b$
5min	$266,5 \pm 0,5ab$	$1,70 \pm 0,02ab$	$266,0 \pm 0,0ab$	$1,62 \pm 0,08ab$	200MPa	$265,5 \pm 0,5ab$	$1,75 \pm 0,01a$
10min	$265,5 \pm 0,5ab$	$1,70 \pm 0,05ab$	$265,5 \pm 0,5ab$	$1,68 \pm 0,10ab$	400MPa	$265,5 \pm 0,5ab$	$1,76 \pm 0,02a$
30min	$265,5 \pm 1,5ab$	$1,73 \pm 0,08ab$	$266,0 \pm 1,0ab$	$1,80 \pm 0,08a$	600MPa	$265,5 \pm 0,5ab$	$1,71 \pm 0,02a$

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

Se observó que los tratamientos aplicados produjeron una tendencia a disminuir la $\lambda_{\max\text{UV}}$, pero los valores obtenidos no fueron significativamente menores ($p>0,05$) excepto en A8 tratado 5 min a 70 °C (Tabla 2). El cambio de $\lambda_{\max\text{UV}}$ hacia menores longitudes de onda (*blue shift*) indicaría una exposición de los aminoácidos aromáticos a un ambiente más polar (Lange *et al.*, 1996a). Por otro lado, los tratamientos aumentaron las Abs (los TT en mayor medida que los TAPH) (Tabla 2), lo que reflejaría un desplegamiento de la estructura proteica y exposición de aminoácidos aromáticos. Ma y Harwalkar (1988) informaron semejante efecto en globulinas de avena calentadas a 110 °C.

Los tres aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) podrían contribuir a la fluorescencia intrínseca de las proteínas, pero generalmente, los residuos de

triptófano (Trp) son los fluoróforos intrínsecos dominantes, con una longitud de onda de máxima emisión (λ_{\max}) en agua entre 348 y 353 nm. El espectro de fluorescencia depende principalmente de la polaridad del medio en el que están presentes los residuos de Trp y proporciona información sobre los cambios conformacionales de las proteínas (Lakowicz, 1983). La desnaturalización proteica generalmente produce en los espectros de emisión de fluorescencia un cambio de la λ_{\max} hacia mayores longitudes de onda (hacia el rojo, *red shift*), por el desplegamiento de la estructura proteica y exposición de los Trp a un ambiente más polar (el solvente acuoso) (Kronman y Holmes, 1971, Lullien-Pellerin *et al.*, 2001). Cuando los residuos de Trp son protegidos por la matriz proteica de la fase acuosa, el entorno se vuelve menos polar, se produce un cambio hacia menores longitudes de onda (hacia el azul, *blue shift*) (Vladimirov y Burstein, 1960).

A8 y A10 sin tratar presentaron λ_{\max} a $348,5 \pm 0,7$ nm y $344,7 \pm 0,3$ nm, respectivamente ($p < 0,05$, Figura 2). Estos resultados sugieren que los Trp de A10 podrían encontrarse en ambientes más hidrofóbicos que los de A8. Los valores de la intensidad de fluorescencia (IF) fueron 30183 ± 716 y 29004 ± 1978 IF/mg/mL para A8 y A10, respectivamente, sin diferencias significativas ($p > 0,05$, Figura 2).

Los TT indujeron un desplazamiento hacia el rojo en la λ_{\max} en A8 ($p < 0,05$, Figuras 2a y c). Por el contrario, los TT no causaron ningún cambio significativo en la λ_{\max} correspondiente a A10 (Figura 2b y d). Ma y Harwalkar (1988) informaron que el tratamiento a 110 °C de la fracción de globulina de avena indujo un desplazamiento de la λ_{\max} hacia mayores longitudes de onda, a medida que aumentaba el tiempo del tratamiento, atribuyendo a un mayor grado de desnaturalización proteica exponiendo los residuos de Trp a un entorno más polar. La IF de ambos aislados disminuyó significativamente después de los TT ($p < 0,05$), principalmente a 70 °C (Figura 2a y b). Por otro lado, los TAPH indujeron en A8 un cambio hacia el azul en la λ_{\max} , principalmente cuando se aplicó el tratamiento a 400 MPa (Figura 2e). Lange *et al.* (1996b) plantea que el apilamiento de residuos aromáticos es favorecido por las APH, lo que explicaría un cambio hacia un entorno más hidrofóbico. Contrariamente, Yin *et al.* (2008) informaron cambios en la λ_{\max} hacia mayores longitudes de onda en aislados proteicos de frijol tratado a 600 MPa. De la misma forma que los TT, los TAPH no produjeron cambios significativos ($p > 0,05$) en la λ_{\max} de A10, pero se observó una leve tendencia de un cambio hacia el rojo (Figura 2f). Los valores de IF de ambos aislados sufrieron una disminución significativa ($p < 0,05$) sólo con los tratamientos a 400 y 600 MPa (Figura 2e y f), condiciones que habían provocado un mayor grado de agregación que el tratamiento a 200 MPa (Figura 1e).

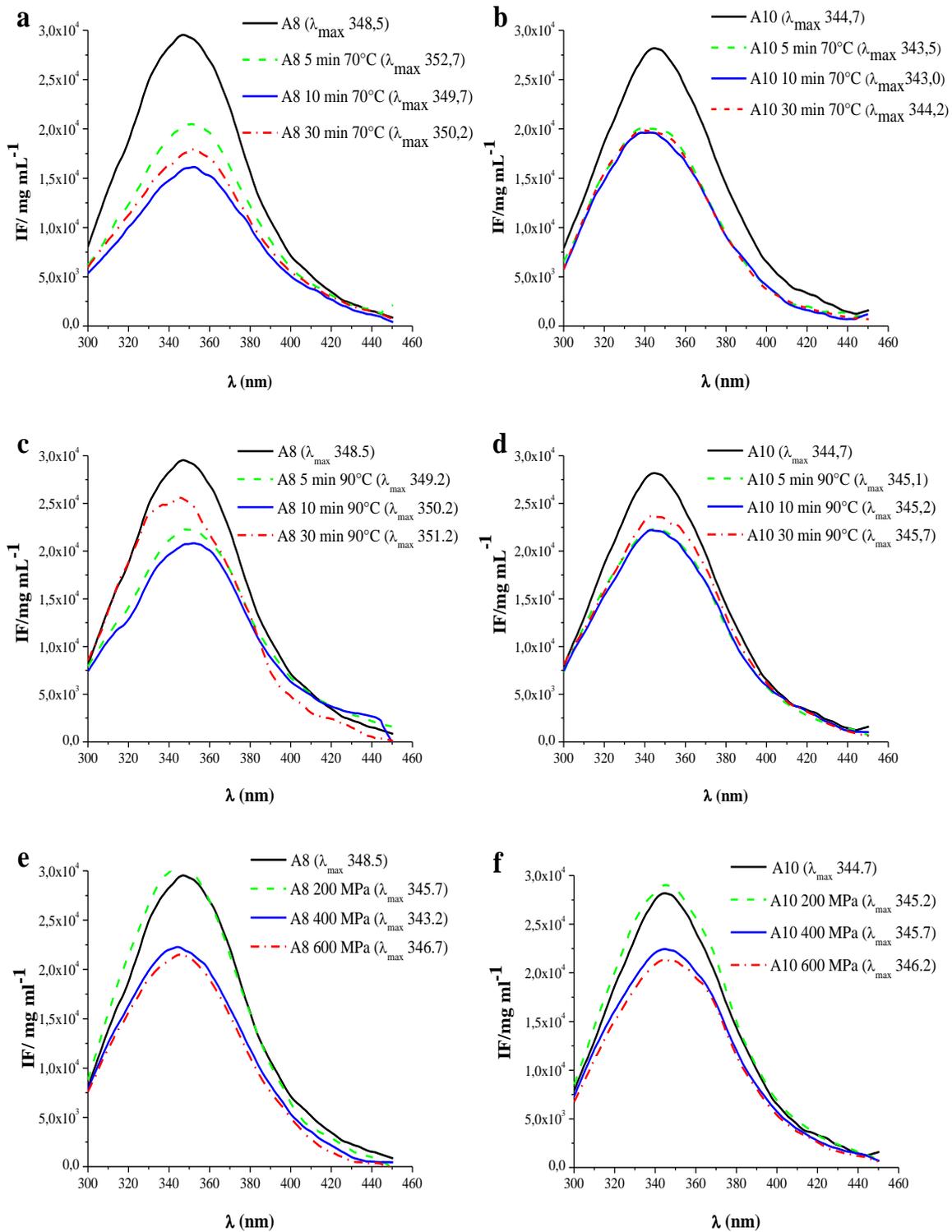


Figura 2: Espectros de fluorescencia intrínseca de A8 y A10 sin tratar o sometidos a TT o TAPH, normalizados por la concentración proteica. a) A8 tratado a 70 °C. b) A10 tratado a 70 °C. c) A8 tratado a 90 °C. d) A10 tratado a 90 °C. e) A8 tratado con APH. f) A10 tratado con APH.

Nuestros datos indican que A8 y A10 reaccionaron de forma diferente cuando fueron sometidos a los mismos tratamientos. A8 fue más propenso que A10 a cambios conformacionales que afectaron el microambiente de los Trp. Posiblemente, la alta

concentración de OH⁻ durante la extracción de proteínas haya modificado el microambiente de los Trp en A10 dejándolos más enmascarados o protegidos por la matriz proteica, cambiando así su sensibilidad a tratamientos posteriores. A su vez, estos datos indican que los TT y los TAPH provocaron la exposición de Trp a diferentes entornos acompañado de una disminución de la IF. Los agentes que interfieren en la emisión de fluorescencia en las proteínas son los residuos de lisina e histidina y los enlaces disulfuro (Lakowicz, 1983; Permyakov, 1993). En nuestro caso, los enlaces disulfuro que estabilizaron los agregados solubles descritos en la Sección 2.1. podrían ser responsables de la disminución de la IF que se encontró en los espectros de fluorescencia de los aislados tratados.

2.2.2. Efecto *in situ* de las APH

Para evaluar el efecto de las APH *in situ*, se determinaron los espectros de absorción en el UV y de emisión de fluorescencia de dispersiones proteicas de A10, analizando los efectos producidos en las etapas de compresión y descompresión. Se eligió trabajar con A10 dado que en la primera parte de esta Sección los cambios irreversibles observados a causa de las APH fueron menos pronunciados que en A8.

El análisis de los espectros de absorción en el UV se realizaron evaluando la cuarta derivada de la absorbancia en función de la longitud de onda, que refleja los cambios de la polaridad del entorno de los aminoácidos aromáticos de una manera más sensible, asociando la señal del pico máximo cercano a 283 nm a la tirosina (Tyr) y la del mínimo cercano a 290 nm al Trp, según el método del cambio espectral (Lange *et al.*, 1996a, Lange *et al.*, 1996b y Mombelli *et al.*, 1997). Esta metodología fue utilizada para el estudio de cambios conformacionales causados por las APH en diferentes proteínas (Lange y Balny, 2002). Por otro lado, también se registró la absorbancia a 350 nm, ya que cambios en la dispersión de la luz se asocian a cambios en la conformación y tamaño de las partículas proteicas (Deng *et al.*, 1976).

Para caracterizar los espectros de fluorescencia se calculó el centro de masa espectral (CSM). El CSM refleja el cambio global del microambiente de los aminoácidos aromáticos de las proteínas (Blayo *et al.*, 2014).

En la cuarta derivada de los espectros de absorción se observó un máximo a 284 nm y un mínimo a 296 nm. Durante la etapa de compresión (de 10 a 450 MPa) hubo corrimientos del máximo y del mínimo hacia menores longitudes de onda (*blue shift*)

(Figura 3a, flecha azul). La señal de la Tyr disminuyó (Figura 4a) y la señal del Trp aumentó (Figura 4b) durante la etapa de compresión. Estos comportamientos indicarían exposición de los residuos aromáticos a ambientes más polares (Lange *et al.*, 1996b; Lange y Balny, 2002). A su vez, la absorbancia a 350 nm de la dispersión de A10 disminuyó con el aumento de la presión (Figura 4c) a causa del cambio conformacional de las proteínas (las proteínas globulares desplegadas podrían dispersar menos la luz).

Durante la etapa de descompresión los corrimientos del máximo y del mínimo de la cuarta derivada de los espectros de UV fueron hacia mayores longitudes de onda (*red shift*) (Figura 3b, flechas rojas) y la señal correspondiente a Tyr aumentó y la correspondiente a Trp disminuyó (Figura 4a y b respectivamente). En este caso, estos efectos estarían indicando menor polaridad del microambiente de los aminoácidos aromáticos a causa de enmascaramiento de los mismos por parte de la estructura proteica. La absorbancia a 350 nm no presentó cambios en la etapa de descompresión (Figura 4 c).

Al ocurrir comportamientos opuestos (*blue shift* y *red shift*) en la etapa de compresión y descompresión, el efecto final del tratamiento con APH resultó en ausencia de cambios significativos en la longitud de onda del máximo y del mínimo, pero sí hubo disminución de la señal. Esto podría explicar los resultados obtenidos en la primera parte de esta Sección para A10, que no se debieron a falta de sensibilidad al tratamiento, sino a la reversibilidad de parte de los efectos de las APH.

En los gráficos de la Figura 4 se puede observar que a partir de los 300 MPa los cambios ya no fueron significativos durante la compresión, y durante la etapa de descompresión recién cuando el nivel de presión fue menor a 300 MPa los cambios en las señales de los máximos (Figura 4a) y mínimos (Figura 4b) se hicieron significativos.

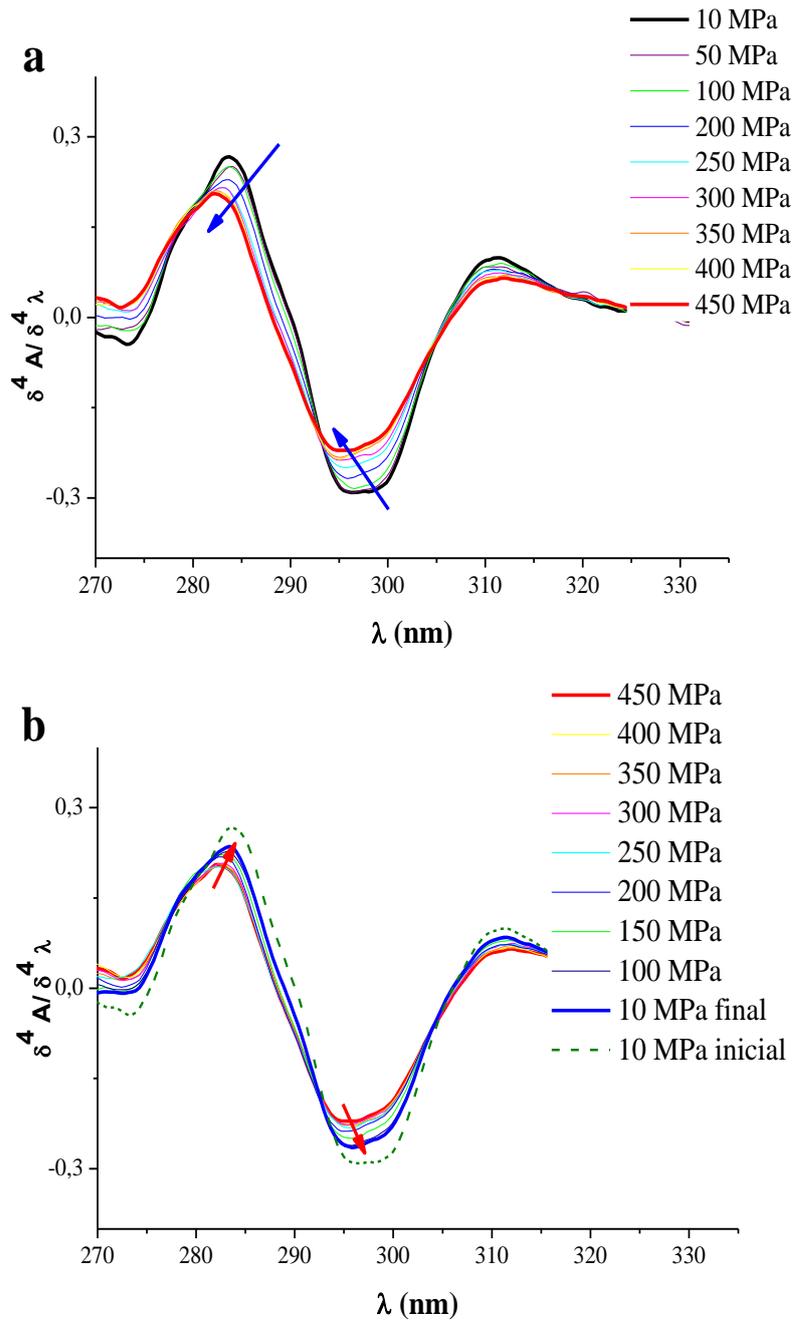


Figura 3: Cuarta derivada de los espectros de absorbancia en el UV de A10 sometidos a APH. **a)** Etapa de compresión de 10 a 450 MPa y **b)** etapa de descompresión de 450 a 10 MPa. Las flechas indican cambios de los máximos y mínimos, hacia menores (flechas azules) o mayores (flechas rojas) longitudes de onda.

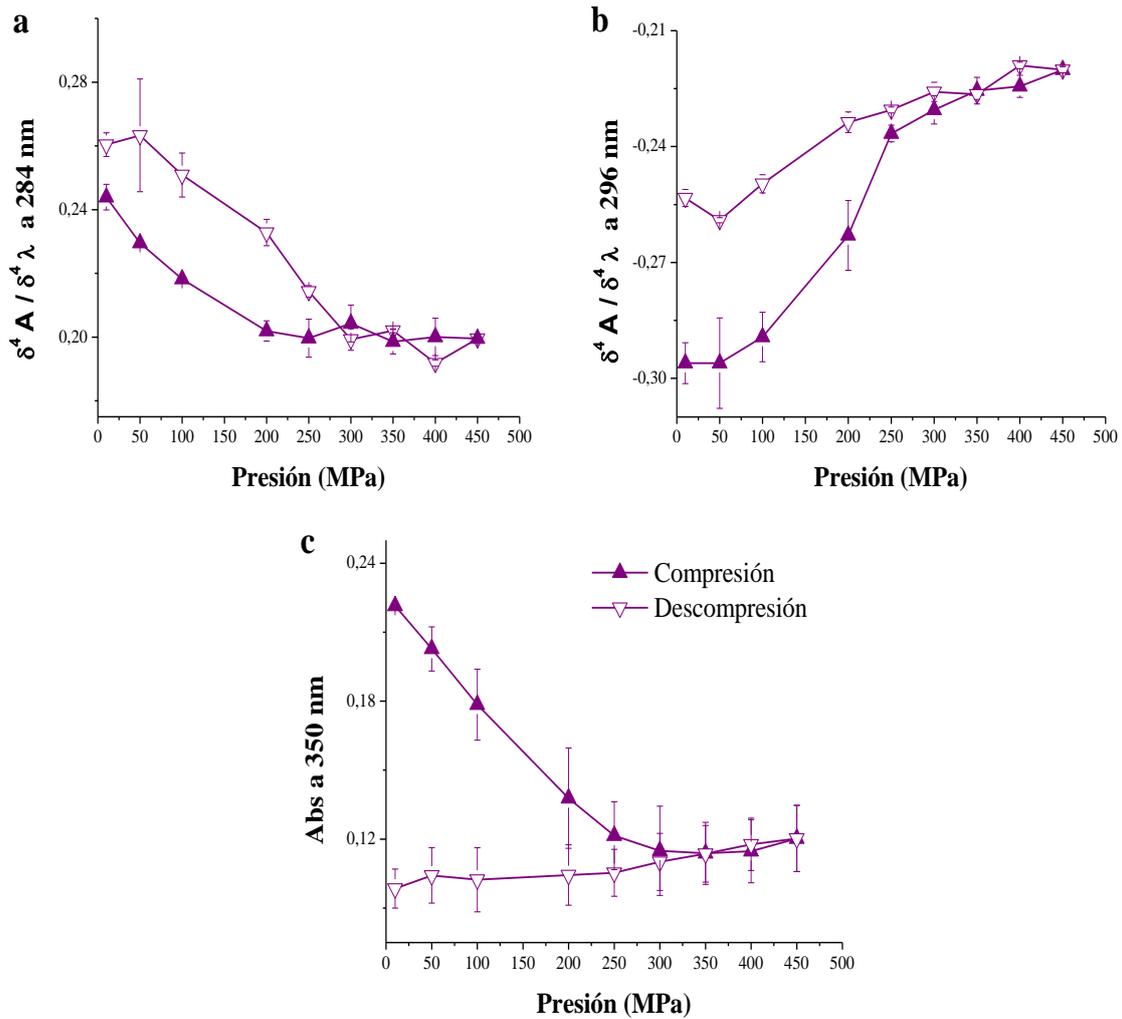


Figura 4: Cuarta derivada de los espectros de absorbancia en el UV de A10 sometido a APH a) Pico máximo a 284 nm (Tyr) b) Pico mínimo a 296 nm (Trp). c) Abs a 350 nm en función de la presión. Etapa de compresión (símbolos llenos) y etapa de descompresión (símbolos vacíos).

En la Figura 5 se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de dispersiones de A10 durante las etapas de compresión y descompresión, variando el nivel de presión final alcanzado (200, 400 o 600 MPa), y en la Figura 6a el CSM de cada espectro que representa el cambio global del microambiente de los aminoácidos aromáticos. En la etapa de compresión se observó disminución de la IF y aumento de la λ_{\max} (*red shift*, Figura 5, flechas rojas), dando una disminución del CSM (Figura 6a, símbolos llenos), indicando aumento de la polaridad de los microambientes de los aminoácidos aromáticos. Por otro lado, en la etapa de descompresión, la IF aumentó, la λ_{\max} disminuyó (*blue shift*, Figura 5, flechas azules) y el CSM aumentó (Figura 6a, símbolos vacíos), indicando microambientes menos polares de los aminoácidos aromáticos. Estos resultados concuerdan con los efectos encontrados en los espectros de absorción del UV, donde en la etapa de compresión se produjo la exposición de los

aminoácidos aromáticos y en la descompresión enmascaramiento de los mismos en la matriz proteica.

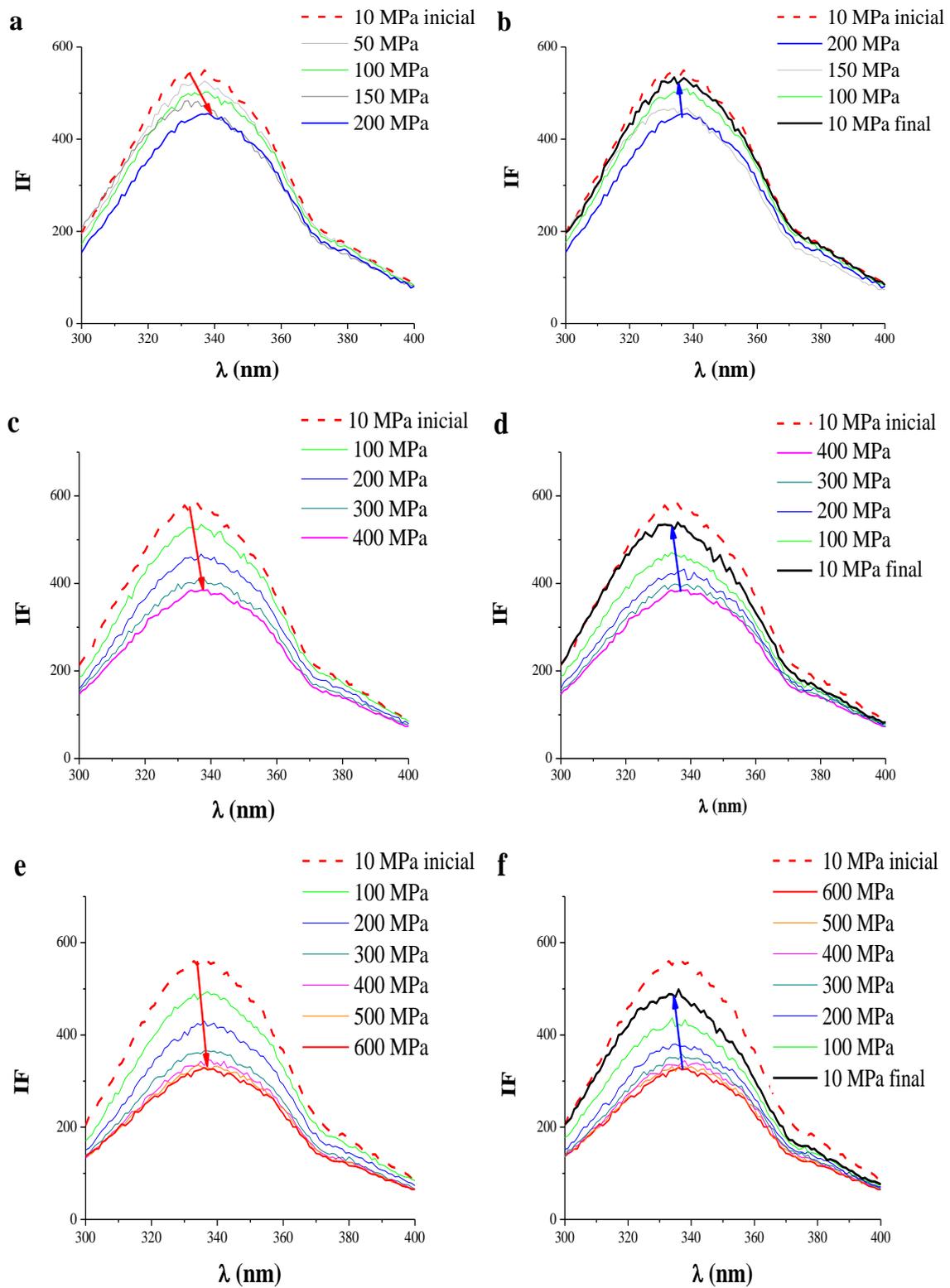


Figura 5: Espectros de emisión de fluorescencia de A10 sometidos a APH durante la etapa de compresión (a, c y e) y durante la etapa de descompresión (b, d, y f) variando la presión final (200, 400 o 600 MPa). Flechas rojas indican *red shift*, flechas azules indican *blue shift*.

En la Figura 5 se observa que los cambios en IF debidos a la compresión (o descompresión, en el sentido opuesto) de 10 a 100 MPa, de 100 a 200 MPa o de 200 a 300 MPa fueron de mayor magnitud que los siguientes cambios a presiones mayores (las curvas correspondientes a 400, 500 y 600 MPa tuvieron muy poca diferencia en IF). El estado final presentó una λ_{\max} similar a la del estado inicial, coincidiendo con lo expuesto en la Sección 2.2.1., pero con esta metodología se pudo demostrar que las APH produjeron cambios conformacionales en A10 que perduraron mientras duró el tratamiento y fueron reversibles incluso a la mayor presión ensayada (600 MPa).

En la Figura 6a se observa que a partir de 300 y hasta 600 MPa el CSM permaneció constante en la etapa de compresión y descompresión. Sin embargo, durante la descompresión, desde 300 MPa los valores del CSM fueron mayores que los de la curva de compresión. Cuando la presión máxima fue 400 o 600 MPa el punto final tuvo un valor mayor al del inicial, en cambio cuando la presión final fue 200 MPa la diferencia del CSM final e inicial fue menor y con signo opuesto. Este efecto indicaría la dependencia con el nivel de presión alcanzado durante el tratamiento. Calculando los CSM de los espectros de emisión de fluorescencia de muestras tratadas y liofilizadas presentados en la Sección 2.2.1. (Figura 6b), se observan aumentos de CSM, como en los estados finales de las dispersiones tratadas hasta 400 y 600 MPa en esta Sección. El aumento de CSM final representa un *blue shift* de la λ_{\max} , indicando enmascaramiento de los aminoácidos aromáticos en la matriz proteica a causa de la agregación. Las diferencias en el aumento de los CSM de ambas Secciones se podrían deber a la diferencia en concentración proteica de las dispersiones durante el TAPH.

Con esta metodología se pudieron diferenciar los fenómenos que ocurren durante las etapas de compresión y descompresión durante los TAPH, los resultados obtenidos indicarían que durante el aumento de presión se produjo el desplegamiento de la estructura proteica y durante la descompresión ocurriría la agregación. Para las proteínas de caupí al superar los 300 MPa se producirían los mayores (e irreversibles) cambios conformacionales con posterior agregación. El estudio de los cambios conformacionales *in situ* causados por las APH también se realizó en gliadina de trigo (Lullien-Pellerin *et al.*, 2001), en este caso los cambios conformacionales fueron totalmente reversibles, atribuyendo a la estructura elástica que presenta este tipo de proteínas. En los APC las proteínas predominantes son las globulinas, presentando estructuras globulares sensibles a la desnaturalización y agregación a causa de las APH. Considerando que los APC contienen un conjunto heterogéneo de proteínas los cambios reversibles que se detectaron

con esta metodología, no necesariamente estarían indicando que las proteínas vuelven a su estado nativo.

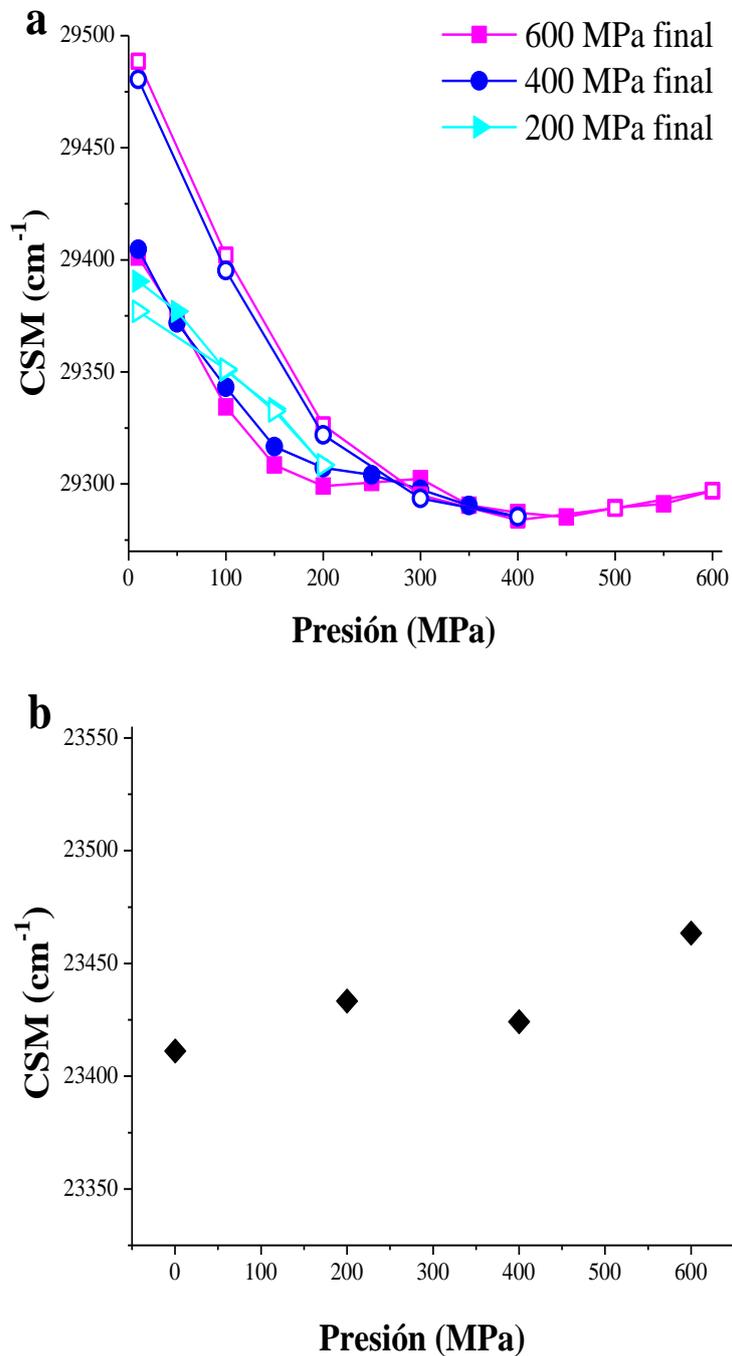


Figura 6: **a)** CSM obtenidos de los espectros de emisión de fluorescencia de A10 sometidos a APH, variando el nivel de presión final (200 (▶celeste), 400 (●azul) o 600 (■violeta) MPa). Etapa de compresión (símbolos llenos) y etapa de descompresión (símbolos vacíos). **b)** CSM de muestras de A10 sin tratar o sometidas a TAPH obtenidos de los espectros de fluorescencia presentados en la Figura 2 representando los efectos irreversibles de los TAPH.

2.3. Hidrofobicidad superficial

La hidrofobicidad superficial (H_o) de A10 duplicó la de A8 (Tabla 3). Esto podría deberse a cambios irreversibles durante el proceso de extracción de proteínas, que condujeron a un desplegamiento parcial de los polipéptidos. Este resultado está de acuerdo con los de espectroscopía de fluorescencia, donde A10 presentó valores de λ_{max} inferiores a los de A8, indicando que los Trp de A10 estaban rodeados por un ambiente menos polar.

Los TT indujeron un aumento significativo ($p < 0,05$) en los valores H_o de ambos aislados (Tabla 3). El aumento máximo en H_o se detectó en A10 (149%) y ocurrió después de los TT a 70 °C (para esta temperatura A8 llegó a tener un aumento del 36%). Después de los TT a 90 °C, el aumento máximo en H_o fue de 74% para A10 y de 81% para A8. Con los tiempos más cortos de los TT, A8 presentó los valores más altos de H_o (Tabla 3), lo que sugiere que podrían ocurrir reordenamientos de la estructura a los mayores tiempos de TT (principalmente a 70 °C). En el caso de A10, los valores más altos se obtuvieron a 70 °C, lo que sugiere que el reordenamiento podría ocurrir al aumentar la temperatura del TT (a 90 °C). Tang *et al.* (2009) observaron que la H_o de aislados proteicos de *Phaseolus* aumentaba con tratamientos de 30 min a 95 °C, pero con tratamientos de 60 y 120 min a esa temperatura, la H_o comenzaba a disminuir, lo que atribuyeron a la exposición de aminoácidos no polares seguida de un reordenamiento y agregación de los polipéptidos.

En el caso de los TAPH, los aumentos máximos en la H_o fueron 153 y 22% para A8 y A10, respectivamente. Para el aumento final de la H_o a causa de las APH se debe considerar que proviene del resultado de la etapa de desplegamiento de la estructura proteica durante la compresión y la reestructuración y agregación durante la descompresión (Sección 2.2.2.). No se observó efecto significativo ($p > 0,05$) del nivel de presión (entre 200 y 600 MPa, Tabla 3). Yin *et al.* (2008) reportaron un aumento en la H_o de un aislado de *Phaseolus vulgaris* sometido a APH, significativo para 600 MPa pero no para 200 o 400 MPa.

Nuestros resultados muestran que los APC pueden tener valores de H_o en un amplio rango (de 1356 a 6764 IF/mg.mL⁻¹ de proteína) aplicando diferentes TT o TAPH. A8 y A10 mostraron una sensibilidad diferente a los tratamientos: la H_o de A8 aumentó más con los TAPH, mientras que la H_o de A10 aumentó más con los TT a 70 °C. Como la composición polipeptídica de A8 y A10 fue semejante (Sección 2.1.) esta diferencia se debería al estado inicial de las proteínas, A10 ya presentaba mayor H_o a causa del proceso de extracción, por lo que el tratamiento más leve (70 °C) permitió seguir exponiendo sitios

hidrofóbicos, en cambio con los otros tratamientos, el aumento de la exposición fue relativamente menor, tal vez por diferencias en el proceso de agregación. En A8 los TAPH lograron exponer la mayor cantidad de sitios hidrofóbicos, igualando la H_o entre A8 y A10.

Tabla 3: H_o (IF/mg.mL⁻¹ de proteína) de A8 y A10 sin tratar o sometidas a TT (70 o 90 °C, a diferentes tiempos) o a TAPH (200, 400 o 600 MPa)

	<u>TT 70 °C</u>	<u>TT 90 °C</u>		<u>TAPH</u>
A8	1356 ± 80f	1356 ± 80f	A8	1356 ± 80c
5 min	1843 ± 47d	2263 ± 40de	200 MPa	3401 ± 87a
10 min	1807 ± 41d	2450 ± 14d	400 MPa	3439 ± 202a
30 min	1548 ± 67e	2160 ± 62e	600 MPa	3450 ± 69a
A10	2708 ± 178c	2708 ± 17c	A10	2708 ± 178b
5 min	6140 ± 183b	4250 ± 48b	200 MPa	3172 ± 38a
10 min	6745 ± 166a	4380 ± 49b	400 MPa	3472 ± 33a
30 min	6764 ± 150a	4715 ± 49a	600 MPa	3297 ± 196a

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

2.4. Comportamiento térmico

Tanto A8 como A10 no tratados presentaron una endoterma con un pico principal, ancho y asimétrico, correspondiente principalmente a las vicilinas (Horax *et al.*, 2004a). Las temperaturas de desnaturalización (T_d) fueron $83,96 \pm 0,07$ °C y $84,60 \pm 0,17$ °C para A8 y A10, respectivamente ($p < 0,05$). Estas T_d están en el rango correspondiente a las proteínas en los termogramas típicos de harinas de caupí (Avanza *et al.*, 2013) y en los APC (Horax *et al.*, 2004a). La mayor T_d de A10 con respecto a la de A8 pudo deberse al mayor contenido de sal, que se formó durante el proceso de extracción, ya que se requirió más NaOH para alcanzar pH 10,0 y se necesitó más HCl para neutralizar los OH⁻ durante la precipitación de proteínas. La presencia de sales generalmente aumenta la estabilidad térmica de las proteínas vegetales de almacenamiento (Arntfield *et al.*, 1986; Añón *et al.*, 2011 y Messin *et al.*, 2013). Además, las especies proteicas formadas cuando la

extracción se realizó a pH 10,0, podrían presentar mayor estabilidad a causa de cambios conformacionales. Las entalpías de desnaturalización (ΔH) fueron de $10,49 \pm 0,60$ y $10,29 \pm 1,17$ J/g de proteínas para A8 y A10, respectivamente, sin diferencias significativas entre ellas ($p > 0,05$). Estos valores de ΔH son semejantes a los obtenidos por Horax *et al.* (2004a), pero son mayores que los reportados por Mwasaru *et al.* (1999a) (5,01 J/g) después de un procedimiento de extracción llevado a cabo a pH de 8,5. La desnaturalización informada por Mwasaru *et al.* (1999a) podría ser debida a la agitación energética (8500 rpm), que se llevó a cabo durante el proceso de extracción y/o a la etapa de secado a 50 °C durante 48 h. Además, Mwasaru *et al.* (1999a) informaron una disminución del ΔH con el aumento del pH de extracción. Sin embargo, en esta Sección no se observaron diferencias significativas en ΔH entre A8 y A10 no tratados, a pesar de las diferencias que se observaron en fluorescencia intrínseca, H_o y Td. Dado que ΔH surge del balance entre reacciones endotérmicas (tales como disociación de enlaces puente de hidrógeno) y reacciones exotérmicas (como la disociación de interacciones hidrofóbicas y agregación de proteínas) (Privalov, 1979), los valores de ΔH similares pueden corresponder a diferentes especies proteicas que provienen de los cambios estructurales de los componentes de los APC.

Después de los TT, se encontró una disminución significativa ($p < 0,05$), en los ΔH de ambos aislados, lo que indica desnaturalización de las proteínas, concordando con los cambios detectados en H_o y espectros de fluorescencia. Los comportamientos de ambos APC en términos de grado de desnaturalización (GD) después de los tratamientos fueron similares, sin diferencias significativas entre A8 y A10, excepto para los TT a 90 °C donde A8 alcanzó un GD mayor que A10 (Tabla 4). A 70 °C, el tiempo de tratamiento influyó en el GD: para 5 y 30 min los GD de ambos APC fueron de 44 y 75% ($p < 0,05$), respectivamente. A 90 °C, el GD fue del 78% (promedio de ambos aislados y ambos tiempos) y no se detectó efecto del tiempo de tratamiento (Tabla 4). Avanza y Añón (2007) informaron para aislado proteico de amaranto un GD de 30% cuando se calentó a 70 °C y 55-75% cuando se calentó a 90 °C, rangos semejantes a los encontrados en nuestro caso para los APC.

Tabla 4: GD (%) de A8 y A10 sometidos a TT (70 o 90 °C, durante diferentes tiempos) o a TAPH (5 min a diferentes niveles de presión).

		A8	A10
TT 70 °C	5 min	40,8 ± 4,4b	46,3 ± 5,3b
	30 min	75,1 ± 4,9a	74,7 ± 4,3a
TT 90 °C	5 min	76,8 ± 8,6a	79,4 ± 3,0a
	30 min	85,3 ± 1,1a	71,9 ± 4,4a
TAPH	200 MPa	43,7 ± 7,5b	38,8 ± 4,2b
	400 MPa	70,3 ± 4,7a	58,8 ± 8,1ab
	600 MPa	69,9 ± 1,3a	64,6 ± 4,6ab

Promedio ± error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Después de los TAPH, el GD dependió del nivel de presión aplicado: a 200 MPa se alcanzó un GD de 41% (promedio de ambos APC), mientras que a 400 y 600 MPa se alcanzó un GD de 66% (promedios tanto de los dos aislados como de los dos niveles de presión, Tabla 4). La desnaturalización inducida por APH indicaría que el volumen ocupado por una dispersión acuosa de proteínas nativas es mayor que el de una dispersión que contiene proteínas desplegadas. El desplegamiento inducido por APH permite que las moléculas de agua se unan a los residuos de aminoácidos expuestos en la superficie, o que ocupen cavidades, aumentando la hidratación de las proteínas (Mozhaev *et al.*, 1996). Condés *et al.* (2012) informaron GD de 75 y 95% a 200 y 600 MPa, respectivamente para aislado proteico de amaranto y Speroni *et al.* (2010a) del 28, 80 y 84% a 200, 400 y 600 MPa, respectivamente, para aislados proteicos de soja. Estos datos indican que la sensibilidad de los APC al TAPH es menor que la de las proteínas de amaranto y similar a la de las de soja.

3. Efecto de TT y TAPH sobre propiedades funcionales

3.1. Solubilidad proteica

A8 y A10 exhibieron alta solubilidad proteica (S_o) en agua, $91,5 \pm 3,4$ y $93,6 \pm 3,6\%$, respectivamente (Tabla 5). Estos valores pertenecen al rango informado por Rangel

et al. (2003) para vicilinas purificadas de arveja y caupí y para APC, trabajando a una concentración de proteína más baja (0,5 mg/mL) que la de nuestro trabajo (1,0 mg/mL).

La S_o de A8 después del TT a 70 °C disminuyó a medida que aumentó el tiempo de TT. El valor más bajo de S_o se encontró después de un tratamiento durante 30 min (72%). En contraste, para el TT a 90 °C no se detectaron cambios en S_o , excepto para el tiempo más largo, donde se observó una ligera disminución ($S_o = 85\%$; $p < 0,05$, Tabla 5). La disminución en S_o debido a TT pudo deberse a la formación de agregados insolubles, principalmente a 70 °C. A 90 °C, se produciría principalmente la formación de agregados solubles, de acuerdo con los patrones electroforéticos obtenidos en la Sección 2.1. (Figura 1c). La S_o del aislado proteico de *Phaseolus vulgaris* aumentó después de 30 min y disminuyó después de 120 min cuando las muestras fueron tratadas a 95 °C, sugiriendo un comportamiento de agregación en dos pasos: agregados que en primer término eran solubles y luego insolubles (Tang *et al.*, 2009).

En el caso de A10, no se encontraron cambios significativos en la S_o a los distintos tiempos y temperaturas de TT (Tabla 5). El comportamiento diferente de A8 y A10 frente a los TT refuerza la idea surgida del análisis de fluorescencia intrínseca y H_o , que indicó la existencia de diferencias en la estructura molecular inicial de A8 y A10.

Después de los TAPH, tanto en A8 como en A10 la S_o disminuyó significativamente ($p < 0,05$) cuando el tratamiento fue a 200 y 400 MPa, mientras que a 600 MPa la S_o fue similar a la de los no tratados (Tabla 5). Para otros aislados proteicos se encontró aumento de la S_o con tratamientos de APH a 400 MPa, en *Phaseolus* (Yin *et al.*, 2008) y en aislado de soja después de 600 MPa, a pH entre 6,4 y 8,0 (Manassero *et al.*, 2015). Chapleau y de Lamballerie (2003) trabajaron con proteínas de *Lupinus albus*, encontrando una S_o del 80% en muestras tratadas a 600 MPa. En conjunto, estos datos sugieren que los TAPH intensos conducen a la solubilización o mantienen la S_o de las proteínas de almacenamiento de varias fuentes vegetales. A pesar de los cambios en la S_o de los APC a causa de los TT y TAPH, A8 y A10 exhibieron valores más altos en comparación con otros aislados proteicos tratados térmicamente, como los de amaranto y soja (Avanza y Añón, 2007; Petruccelli y Añón, 1994).

Tabla 5: S_o (%) y WHC (g agua/g muestra) de A8 y A10 sin tratar o sometidos a TT (70 o 90 °C, durante diferentes tiempos) o a TAPH (5 min a diferentes niveles de presión).

	TT 70 °C		TT 90 °C			TAPH	
	S _o	WHC	S _o	WHC		S _o	WHC
A8	91,5 ± 3,4a	1,05 ± 0,06b	91,4 ± 3,3a	1,05 ± 0,06b	A8	91,4 ± 3,3a	1,05 ± 0,06b
5 min	83,9 ± 1,3b	1,06 ± 0,04b	89,8 ± 1,5a	1,22 ± 0,04a	200 MPa	84,9 ± 1,7c	1,43 ± 0,05a
10 min	77,1 ± 0,6c	1,12 ± 0,01b	89,6 ± 1,5a	1,21 ± 0,03a	400 MPa	86,9 ± 1,1bc	1,14 ± 0,03b
30 min	72,2 ± 2,7d	1,45 ± 0,05a	84,7 ± 1,6b	1,10 ± 0,04b	600 MPa	90,6 ± 1,0ab	0,87 ± 0,06c
A10	93,6 ± 3,6a	0,95 ± 0,01b	93,6 ± 3,6a	0,95 ± 0,01c	A10	93,6 ± 3,6a	0,95 ± 0,01d
5 min	90,6 ± 3,5a	1,34 ± 0,04b	93,3 ± 2,4a	1,09 ± 0,07b	200 MPa	87,5 ± 2,4bc	1,19 ± 0,05c
10 min	88,2 ± 3,6a	1,36 ± 0,08b	93,8 ± 2,3a	1,10 ± 0,02b	400 MPa	86,4 ± 2,4c	1,48 ± 0,06b
30 min	91,4 ± 4,2a	1,55 ± 0,07a	96,5 ± 0,9a	1,49 ± 0,07a	600 MPa	92,1 ± 1,5ab	1,66 ± 0,01a

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

3.2. Capacidad de retención de agua

Los valores de la capacidad de retención de agua (WHC) de A8 y A10 no tratados fueron $1,05 \pm 0,06$ y $0,95 \pm 0,01$ g de agua / g de APC respectivamente; sin diferencias significativas (p>0,05, Tabla 5). Estos valores fueron inferiores a los reportados para APC por otros autores (Ragab *et al.*, 2004; Khalid *et al.*, 2012). Las diferencias pudieron deberse a la alta solubilidad de A8 y A10 y/o a diferencias en los procesos para obtener los aislados en cada trabajo.

Los TT a ambas temperaturas aumentaron la WHC de ambos aislados y los valores más altos se encontraron luego de los 30 min de TT, excepto para A8 luego del TT a 90 °C. En el caso de A8 después del tratamiento a 70 °C, el aumento de WHC pareció correlacionarse con la disminución de S_o (Tabla 5) y con el aumento del GD (Tabla 4), ya que estas tres propiedades variaron en función del tiempo de TT. El efecto de las APH sobre la WHC de A8 fue un aumento con 200 MPa, pero una disminución con 600 MPa (Tabla 5). La disminución de WHC de A8 después de 600 MPa pudo deberse a una importante modificación estructural, reflejada por los cambios en la superficie de las proteínas, como una alta H_o (Tabla 3) y residuos de Trp expuestos a un ambiente más

hidrófobo (Figura 2e), acompañado de un GD del 70% (Tabla 4). Por otro lado, las APH produjeron un importante aumento en WHC en A10 que fue proporcional al nivel de presión aplicado. Petruccelli y Añón (1994) obtuvieron un mayor incremento en WHC cuando los aislados de proteína de soja fueron sometidos a TT a mayor concentración proteica, teniendo así un mayor grado de agregación y una menor solubilidad. En nuestro caso, excepto A8 tratado a 70 °C, se obtuvieron APC con elevada S_o y aumento de la WHC a causa de los tratamientos. El mismo comportamiento fue reportado por Bernardino-Nicanor *et al.* (2005) para las glutelinas de semilla de guayaba.

3.3. Viscosidad aparente

Las dispersiones al 10% p/v de A8 y A10 no tratadas presentaron valores de viscosidad aparente (η^*) similares ($5,75 \pm 0,03$ y $5,97 \pm 0,35$ cP, respectivamente ($p > 0,05$) Figura 7). Después de los TT en A8 hubo una tendencia al aumento en la η^* , que en el caso de 70 °C pudo estar relacionada con la disminución de S_o , formando un sistema más particulado. Además, el aumento de la η^* pudo deberse al aumento del tamaño molecular dado por los agregados solubles inducidos por los TT y detectados por SDS-PAGE (Figura 1). Ragab *et al.* (2004) informaron que el calentamiento de un APC a 70 °C durante 15 minutos resultó en un marcado aumento de la viscosidad utilizando una mayor concentración (20% p/v). Por otro lado, los TAPH disminuyeron de forma significativa la η^* de A8 y A10 (Figura 7, $p < 0,05$). Esta disminución en la η^* pudo ser causada por modificaciones irreversibles en la estructura proteica (desplegamiento), pero también podría deberse a la disociación durante la determinación de la viscosidad de los agregados que se estabilizaban mediante interacciones débiles (Condés *et al.*, 2012).

El comportamiento diferente de la η^* después de TT y TAPH podría estar relacionado con diferentes patrones de agregación (mayor cantidad de especies de mayor peso molecular en las muestras sometidas a TT que en las sometidas a TAPH) como se observó en SDS-PAGE (Figura 1). Por otro lado, la baja concentración de proteínas (1% p/p) empleada durante los TT y TAPH podría ser la causa de que los cambios observados en esta propiedad funcional hayan tenido baja magnitud. Condés *et al.* (2012) propusieron que la concentración de proteínas modulaba los efectos de las APH y tampoco encontraron diferencias significativas entre los valores de η^* de proteínas de amaranto no tratadas y tratadas con APH al 1% (p/p).

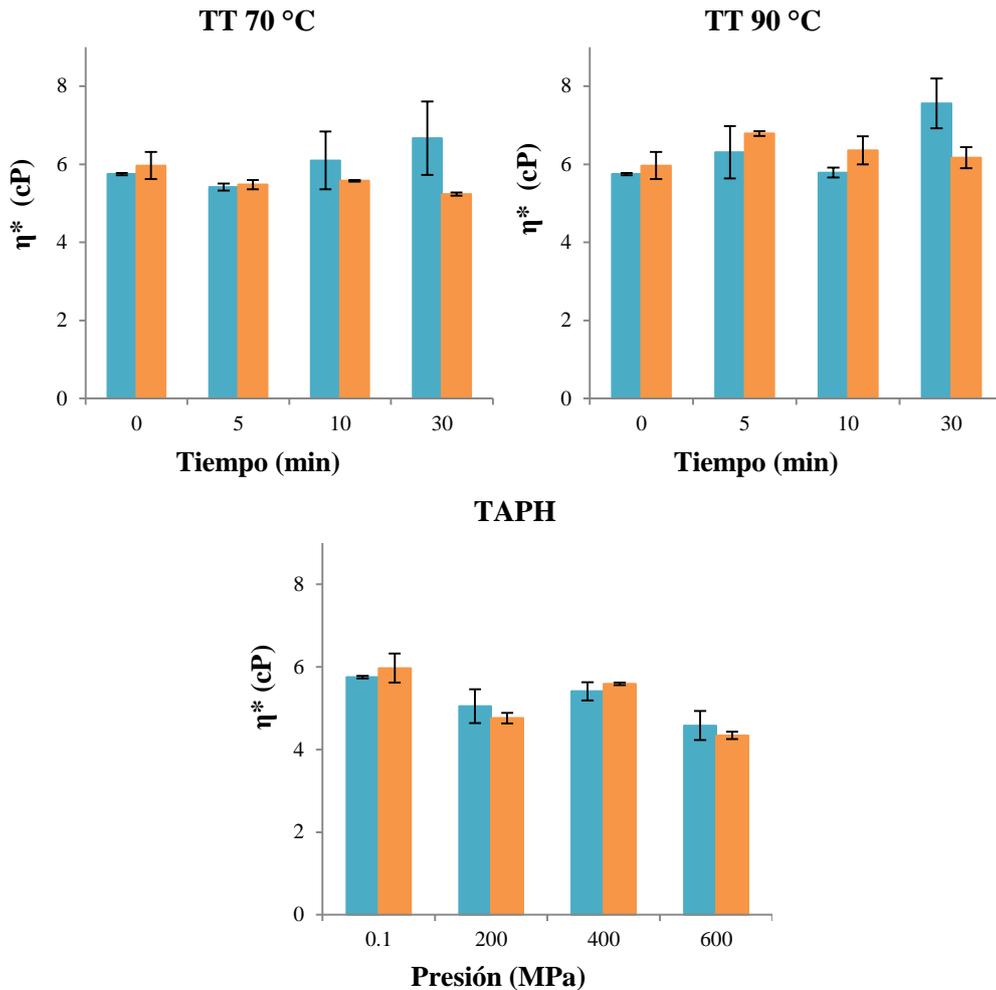


Figura 7: Viscosidad aparente (η^*) de dispersiones proteicas (1% p/v) de A8 (■) y A10 (■), sin tratar o sometidos a TT (70 o 90 °C, durante diferentes tiempos) o a TAPH (5 min a diferentes niveles de presión). Promedio \pm error estándar.

3.4. Mínima concentración de gelificación

La mínima concentración de gelificación (LGC) se determinó con un método sencillo, que no requirió equipamiento específico, en el cual por inspección visual luego de invertir el tubo se determinó la mínima concentración a la cual la dispersión proteica no resbalaba por la pared de un tubo luego de un determinado tratamiento térmico para lograr la gelificación (método de Coffman y García, 1977). Cuanto menor es la LGC, mejor es la capacidad gelificante de las proteínas. A8 y A10 no tratados mostraron una buena capacidad de gelificación, presentando una LGC del 12% p/p (Tabla 6), como fue reportado por Horax *et al.* (2004b) y Khalid *et al.* (2012), en condiciones de gelificación semejantes. La LGC de los APC fue menor que la reportada para aislado proteico de frijol pinto (16% p/p, Tan *et al.*, 2014) y aislado proteico de garbanzo (14 - 18% p/p, Kaur y

Singh, 2007), lo que sugiere que los APC tienen mejor capacidad de gelificación que los aislados proteicos de dichas legumbres.

Tabla 6: LGC de A8 y A10 sin tratar o sometidos a TT (70 o 90 °C, durante diferentes tiempos) o a TAPH (5 min a diferentes niveles de presión).

(%)	TT a 70 °C			TT a 90 °C			TAPH			
	A8	5 min	10 min	30 min	5 min	10 min	30 min	200 MPa	400 MPa	600 MPa
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-
10	±	±	+	+	-	-	-	+	+	±
12	+	+	+	+	-	-	-	++	++	+
14	++	++	++	++	+	+	+	++	++	++
16	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++
A10										
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	±	±	±	±	-	-	-	+	+	±
12	+	+	+	+	-	-	-	++	++	+
14	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
16	++	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++

(-) dispersión proteica líquida, (±) dispersión proteica viscosa, (+) gel débil, (++) gel auto-portante y (+++) gel muy firme.

Para las muestras de A8 tratadas a 70 °C (10 o 30 min) la LGC disminuyó a 10% p/p. La firmeza de los geles, evaluada visualmente, de A10 al 16% p/p mejoró con el pre-tratamiento a 70 °C (Tabla 6). Este aumento en la firmeza pudo deberse a una alta contribución de interacciones hidrofóbicas en el gel, ya que la H_0 de A10 aumentó en gran medida después del tratamiento a 70 °C (Tabla 3). Por otro lado, los TT a 90 °C tuvieron un efecto negativo sobre la capacidad de gelificación, la LGC de A8 y A10 aumentó a 14% p/p (Tabla 6). El efecto negativo del pre-calentamiento a 90 °C en la capacidad de gelificación también se pudo ver en el trabajo de Ragab *et al.* (2004), en que se informó

que el APC no gelificó sin el agregado de NaCl (en el rango de concentraciones entre 6 y 20% p/p). La causa de la baja capacidad para gelificar de ese aislado podría deberse a que el proceso de su obtención involucró un calentamiento a 90 °C durante 10 min. La diferencia en los efectos de ambos TT (70 y 90 °C) podría deberse a diferencias en la estructura de los agregados formados en cada uno de ellos; los agregados formados a 90 °C tendrían una baja capacidad de reacomodarse y formar la red de proteínas. Los mejores resultados se obtuvieron con aislados tratados a 200 y 400 MPa. La LGC disminuyó al 10% p/p y la firmeza aumentó para A8 y A10. Este efecto es opuesto al reportado por Speroni *et al.* (2010), donde el pre-tratamiento con APH no mejoró la gelificación térmica de proteínas de soja, lo que indica un efecto diferente de las APH según la fuente de proteína.

4. Conclusiones parciales

Las proteínas de caupí fueron sensibles a las distintas condiciones a las que estuvieron expuestas, desde la preparación de los APC hasta los tratamientos desnaturizantes (TT o TAPH), que en sus menores niveles de intensidad produjeron modificaciones estructurales y en sus propiedades funcionales.

El proceso de obtención de los APC generó especies moleculares que no estaban presentes en las harinas. La variación del pH de extracción de proteínas provocó diferencias en los aislados obtenidos. Las propiedades fisicoquímicas (λ_{\max} , H_o y Td) de A10 fueron distintas a las de A8. La composición polipeptídica fue similar en ambos aislados, según lo evaluado por SDS-PAGE, por lo tanto estos resultados indican que las diferencias observadas se debieron a cambios en la estructura proteica causados por la exposición a pH 10,0 por 60 min durante el proceso de obtención del aislado A10. El aumento del pH de extracción proteica resultó una estrategia económica y simple de modificar significativamente los APC.

Los resultados presentados demuestran que los TT y los TAPH indujeron cambios en las propiedades fisicoquímicas y funcionales que fueron más drásticas en A8 que en A10. Esta diferencia de sensibilidad sería atribuible al hecho de que la estructura o conformación de las proteínas de A10 ya habían sido modificadas por el alto pH de extracción.

Ambos TT y TAPH indujeron la formación de agregados solubles estabilizados en parte por puentes disulfuro, aunque con distinta composición para cada tipo de tratamiento.

La solubilidad en agua de los APC tanto antes como después de los tratamientos fue alta (el menor valor fue 72% y se obtuvieron aislados bajo muchas condiciones con solubilidad mayor a 90%) lo que representa una característica destacable para proteínas vegetales de reserva.

Aunque ambos tratamientos lograron modificar las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas, la estructura inicial que presentaron influyó en la sensibilidad a cada tratamiento y por lo tanto la intensidad de los cambios. Diferencias notables entre A8 y A10 en los comportamientos después de los tratamientos se encontraron para la S_o , H_o , la fluorescencia intrínseca y la WHC. Los tratamientos con APH fueron más eficientes que los TT para mejorar ciertas propiedades funcionales, como la LGC y la WHC.

Capítulo II

Proceso térmico de gelificación de APC.

Efecto del pre-tratamiento con APH.

Efecto de la incorporación de calcio.

1. Caracterización del proceso térmico de gelificación de los APC

1.1. Condiciones críticas de gelificación

Las definiciones de las condiciones críticas de gelificación son operativas y se establecen tanto en función de las tecnologías disponibles (reología de pequeña deformación, perfil de textura, inversión de tubo e inspección visual) como en función de características de las muestras (por ejemplo, en ciertos sistemas los valores de G' son mayores que los de G'' antes de la gelificación). De esta manera, algunos autores consideran que una muestra comienza a ser un gel cuando G' es igual a G'' , mientras que otros consideran al sistema como gel cuando G' es n veces mayor que G'' . Otros autores, como Renkema *et al.* (2001), definen el comienzo de la gelificación en función de la velocidad de crecimiento de los módulos en función de la temperatura, por ejemplo cuando G' crece más rápido que $0,5 \text{ Pa}/^\circ\text{C}$. En el presente trabajo se definieron dos parámetros, el Punto de Entrecruzamiento, enfocado en el momento en que comenzara la formación de la matriz gelificada (P_{EC} , $G' = G''$) y el Punto donde $\tan \delta$ se hiciera menor a 0,3, más enfocado en haber alcanzado un cierto grado de viscoelasticidad ($P_{0,3}$, $G'' = 0,3 \times G'$). De estos parámetros, el $P_{0,3}$ se pudo aplicar a la mayoría de las muestras y se empleó para determinar las condiciones críticas de gelificación. Por su parte, el P_{EC} se empleó para completar la caracterización de las dispersiones y comparar sus comportamientos. La concentración crítica de gelificación (CC) se definió como la mínima concentración ensayada a la cual G' superara a G'' y la $\tan \delta$ fuera menor a 0,3, esta condición fue evaluada tanto al finalizar el *plateau*, como al finalizar la etapa de enfriamiento. La temperatura crítica de gelificación (TC) fue definida como la temperatura mínima ensayada a la cual, al finalizar el *plateau* o al finalizar el enfriamiento, se obtuvieran dispersiones proteicas con G' mayor a G'' y $\tan \delta$ menor a 0,3.

1.1.1. Concentración Crítica

Los geles analizados en esta sección se obtuvieron con un ciclo térmico que contó con las siguientes etapas: calentamiento desde 20 a 90 °C a una velocidad de 20 °C/min; *plateau* a 90 °C durante 20 min, y finalmente una etapa de enfriamiento desde 90 a 20 °C a una velocidad de 20 °C/min. Se evaluó el efecto de la concentración proteica sobre las propiedades reológicas de las dispersiones.

Los valores de CC encontrados fueron 9,0% p/p para A8 y 7,5% p/p para A10, en ambos momentos del ciclo térmico (Figura 1 y valores de $\tan \delta$ (indicados con “*”) en la Tabla 3), más adelante en la Sección 1.2.1.). Estos resultados indican que en términos de CC, los polipéptidos de A10 presentaron mayor capacidad de interactuar entre sí tanto durante el calentamiento (90 °C, condición en que se favorecen interacciones hidrofóbicas) como luego del ciclo completo (20 °C, condición en que se suman otras interacciones como puentes de hidrógeno). Esta diferencia pudo deberse a los cambios conformacionales ocurridos durante la extracción proteica al mayor pH, que se discutieron en el Capítulo I. Por otra parte, además de las características propias de las proteínas, las dispersiones de A10 tuvieron un mayor contenido de NaCl (debido a la mayor cantidad de NaOH y HCl empleada para extraer y precipitar las proteínas durante la preparación del aislado). La osmolaridad y contenido de sodio de dispersiones al 10,5 % p/p de proteína de A10 fueron significativamente ($p < 0,05$) mayores a las de A8 ($125,61 \pm 0,48$ mOs y 60 mM y $111,86 \pm 0,51$ mOs y 52 mM respectivamente). La mayor concentración de NaCl probablemente permitió disminuir la repulsión electrostática entre polipéptidos y favorecer también la gelificación a menor concentración proteica en A10 (Renard y Lefebvre, 1992).

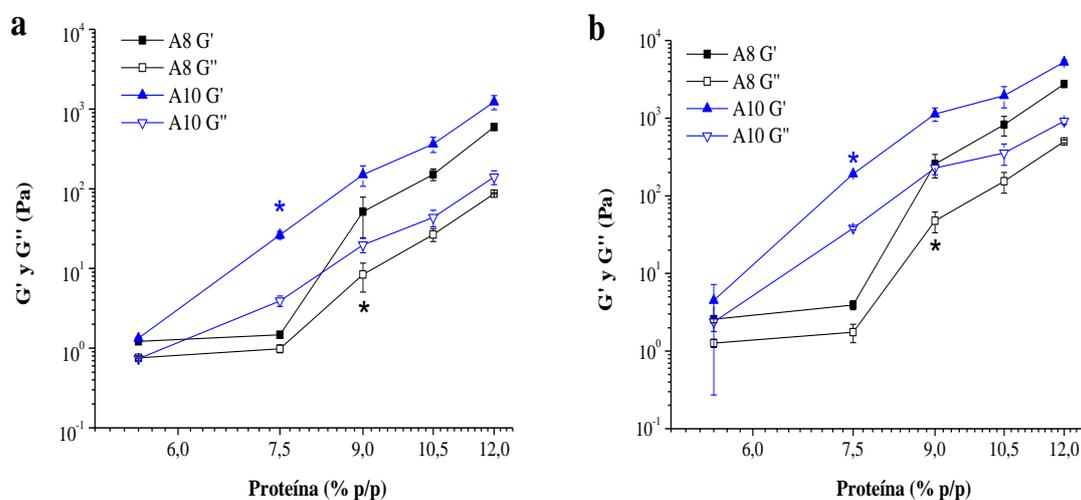


Figura 1: Módulos G' y G'' (a 1 Hz) en función de la concentración proteica de dispersiones de A8 y A10. Ciclos térmicos en reómetro con velocidad de calentamiento y enfriamiento de 20 °C/min. **a)** al finalizar el *plateau* de 20 min a 90 °C. **b)** al finalizar la etapa de enfriamiento hasta 20 °C. (*: CC).

Si bien las condiciones de gelificación como fuerza iónica, temperatura máxima y velocidades de calentamiento y enfriamiento son factores importantes que modifican la CC, las proteínas de origen animal, como las miofibrilares o la gelatina, presentan en la

mayoría de las condiciones CC menores a las de las proteínas vegetales. Para proteínas vegetales, en condiciones semejantes a las del presente trabajo en cuanto a pH (7,0) y sin incorporación de sales, se han informado valores de CC entre 6,5 y 8,0% para aislado proteico de soja (Hermansson, 1978; Renkema y van Vliet, 2004) y 7,0% para aislado proteico de amaranto (Avanza *et al.*, 2005a). Es decir, los APC tienen una capacidad de formar geles semejantes a otras proteínas vegetales de almacenamiento.

En la Sección 3.4. del Capítulo I la LGC de A8 y A10 fue para ambos 12% p/v, la diferencia con la CC determinada en esta Sección se debería a factores como temperatura, tiempo, y velocidades de calentamiento y enfriamiento empleados en el TT para lograr la gelificación, y metodología para determinar la LGC (visualmente por inversión de tubo). Todas estas condiciones influyen en el proceso de gelificación térmica de las proteínas.

1.1.2. Temperatura crítica o tiempo crítico

Los geles analizados en esta sección se obtuvieron a partir de dispersiones proteicas de APC al 10,5% p/p de proteína, concentración superior a la CC de ambos aislados. Las dispersiones se sometieron a un ciclo térmico que contó con las siguientes etapas: calentamiento desde 20 °C a la temperatura máxima variable, a una velocidad de 20 °C/min; *plateau* durante 20 min a dicha temperatura máxima, y finalmente una etapa de enfriamiento, desde la temperatura máxima hasta 20 °C, a una velocidad de 20 °C/min.

En los casos en que se formaron geles, la gelificación comenzó durante el *plateau*, se determinó la TC y el P_{EC} a cada temperatura de *plateau*. La TC fue de 70 °C para A10 y 80 °C para A8 cuando se evaluó al finalizar el *plateau* (Figura 2a) y de 70 °C para ambos aislados al finalizar el enfriamiento (Figura 2b). A mayor temperatura de *plateau*, menor fue el tiempo necesario para alcanzar el P_{EC} (con la excepción de no encontrarse diferencias significativas ($p > 0,05$) entre 90 y 95 °C, Tabla 1). Horax *et al.* (2004b) informaron que se requieren 40 min a 70 °C o 20 min a 80 °C para formar geles firmes de APC al 12%. El P_{EC}, a todas las temperaturas ensayadas, ocurrió a menores tiempos para A10 (Tabla 1), indicando que los polipéptidos de A10 interactuaron entre si más rápidamente que los de A8. La diferencia entre los P_{EC} de A10 y A8 fue máxima (7,1 min) a 70 °C, condición externa menos propicia a la gelificación (porque no se alcanzaría un grado completo de desnaturalización, en la Sección 2.4. del Capítulo I se informó un GD del 44 y 75% para 5 y 30 min a 70 °C, respectivamente). Esto indica que el estado inicial de A10 fue más adecuado para establecer interacciones como las hidrofóbicas. A mayores

temperaturas, el mayor GD probablemente enmascaró las diferencias conformacionales iniciales y disminuyó la diferencia de tiempo de inicio de gelificación entre A8 y A10. Le Bon *et al.* (1999) sostienen que la temperatura mínima de gelificación no existe, sino que el parámetro que rige es la energía de activación, poniendo de manifiesto el carácter cinético de la formación de geles. En nuestro caso, el P_{EC} y la TC se definieron como parámetros operativos y estuvieron condicionados por la concentración proteica y la historia térmica (velocidades de calentamiento y enfriamiento, duración del *plateau*) que se aplicaron en los ensayos.

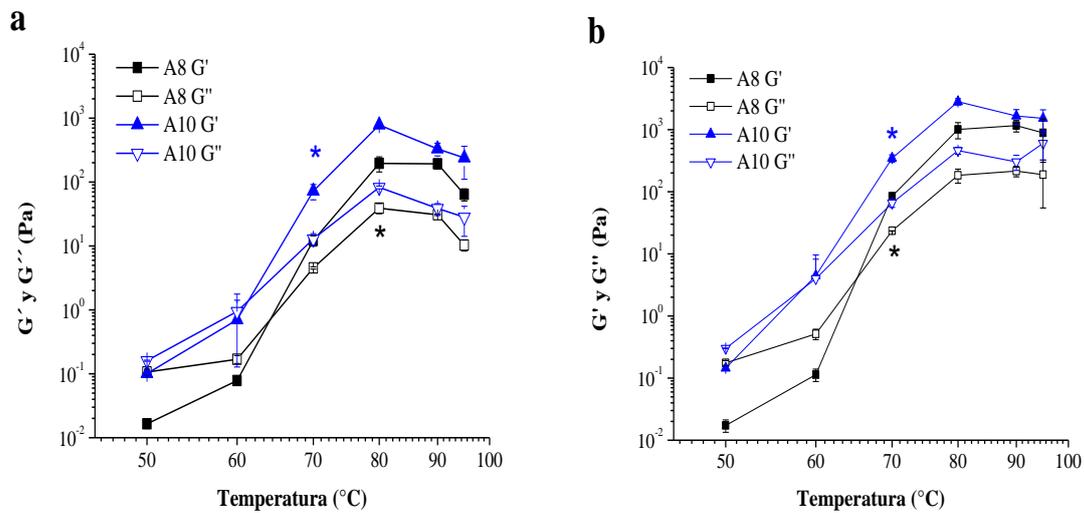


Figura 2: Módulos G' y G'' (a 1 Hz) en función de la temperatura de *plateau* de dispersiones al 10,5% p/p de proteína de A8 y A10. Ciclos térmicos en reómetro con velocidad de calentamiento y enfriamiento de 20 °C/min, **a)** al finalizar el *plateau* de 20 min a temperatura variable **b)** al finalizar la etapa de enfriamiento hasta 20 °C. (*: TC).

Cuanto mayor fue la temperatura de *plateau* menor fue el tiempo necesario para alcanzar un cierto grado de viscoelasticidad ($P_{0,3}$, Tabla 1). Las diferencias entre A8 y A10 fueron más marcadas en el ciclo con *plateau* a 70 °C, el $P_{0,3}$ de A8 ocurrió durante la etapa de enfriamiento ($41,8 \pm 9,8$ °C) mientras que el de A10 a los $13,4 \pm 0,73$ min del *plateau*. Esto indicaría que A8 necesitó nuevas interacciones favorecidas en la etapa de enfriamiento (tipo puente de hidrógeno) para llegar al mismo grado de viscoelasticidad al que llegó A10 en la etapa de calentamiento (Tabla 1).

Tabla 1: P_{EC} y P_{t0,3} de A8 y A10 a diferentes temperaturas de *plateau*.

	Temperatura de <i>plateau</i> (°C)	P _{EC} (min)	P _{t0,3} (min)
A8	50	∞	∞
	60	∞	∞
	70	13,53 ± 0,36a	41,8 ± 9,8 °C [♦]
	80	5,69 ± 0,92b	13,48 ± 1,43a
	90	3,27 ± 0,92c	10,15 ± 0,9b
	95	2,37 ± 0,81cd	7,43 ± 0,2c
A10	50	∞	∞
	60	∞	∞
	70	6,41 ± 0,00b	13,4 ± 0,73a
	80	1,76 ± 0,01cd	4,69 ± 0,19cd
	90	1,26 ± 0,11c	3,74 ± 0,44d
	95	1,15 ± 0,20c	4,29 ± 0,29d

Dispersiones proteicas al 10,5% p/p. Ciclos térmicos en reómetro con velocidad de calentamiento y enfriamiento de 20 °C/min, con *plateau* de 20 min a temperatura variable. Promedio ± error estándar. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas (p<0,05). (♦: temperatura durante la etapa de enfriamiento; ∞: no se alcanzaron el P_{EC} ni el P_{t0,3} a ningún tiempo del ensayo).

1.1.3. Relación con propiedades térmicas

Se realizaron ciclos térmicos en el reómetro con dos temperaturas de *plateau*, 70 o 90 °C, con velocidades de calentamiento y enfriamiento de 1 °C/min (menores que en las Secciones anteriores). Esta velocidad de calentamiento se aplicó también para estudiar las propiedades térmicas de las proteínas de APC por DSC.

Al determinar el P_{EC} se encontró que en ambos aislados, el entrecruzamiento ocurrió antes que cuando el calentamiento se realizó a 20 °C/min. Este efecto se observó tanto para A8 (menor tiempo en el *plateau* a 70 °C o menor temperatura cuando el calentamiento se realizó hasta 90 °C) como para A10, cuyo P_{EC} ocurrió a una temperatura

menor a 70 °C (Tabla 2). Arntfield y Murray (1992) para ovoalbúmina y vicilina de habas y Renkema y van Vliet (2002) para proteínas de soja encontraron que a menor velocidad de calentamiento, la gelificación se iniciaba a menor temperatura a causa de que la desnaturalización ocurría a una menor temperatura. Si la velocidad de calentamiento es baja, la desnaturalización ocurre a menor temperatura que cuando se calienta a mayor velocidad, este fenómeno pone de manifiesto el control cinético de la desnaturalización proteica (Donovan y Beardslee, 1975; Grasso *et al.*, 1995). Por otra parte, la formación de interacciones entre los polipéptidos también tiene un control cinético (Le Bon *et al.*, 1999), por lo que la menor velocidad de calentamiento permitió que la matriz tridimensional comenzara a formarse antes que cuando el ciclo se realizó a mayor velocidad ya que los polipéptidos tuvieron más tiempo para interactuar a cada temperatura. Este fenómeno también se reflejó al evaluar el $P_{10,3}$, ya que a menor velocidad de calentamiento se llegó antes a una matriz con cierto grado de viscoelasticidad.

Analizamos el proceso de gelificación en relación al proceso de desnaturalización, realizando la calorimetría en las mismas condiciones de concentración proteica y velocidad de calentamiento (Figura 3). Los termogramas mostraron un pico ancho y asimétrico similar al registrado en la Sección 2.4. del Capítulo I. Sin embargo, se observó que la T_d y el ΔH de A8 y A10 fueron menores al trabajar a menor concentración proteica y menor velocidad de calentamiento (en el Capítulo I se trabajó a 15% y 5 °C/min, mientras que en este Capítulo a 10,5% p/p y 1 °C/min). La sensibilidad de las propiedades térmicas a la concentración proteica y a la velocidad de calentamiento fue encontrada para otras proteínas como superóxido dismutasa bovina (Grasso *et al.*, 1995), proteínas de maní (Kurganov *et al.*, 2000) y glucógeno fosforilasa de conejo (Colombo *et al.*, 2010). La dependencia entre la concentración y el ΔH indicaría que la desnaturalización implica un primer paso de disociación de polipéptidos. En los APC correspondería a la disociación de agregados estabilizados por interacciones entálpicas como puente de hidrógeno y/o interacciones iónicas que se formaron entre las proteínas sin tratar. En los termogramas de esta Sección se encontró también que A10 tuvo una mayor T_d que A8 ($p < 0,05$), probablemente debida al mayor contenido de NaCl, como se discutió en el Capítulo I. El ΔH de desnaturalización detectado para A10 fue menor que el observado para A8 ($p < 0,05$), debido a que el pH alto durante la extracción proteica habría generado un cierto nivel de desplegamiento (Tabla 2). Este cambio estructural se había evidenciado en la Sección 2.3. del Capítulo I como diferencias en hidrofobicidad, y en la Sección 2.2. como diferencias en

la fluorescencia intrínseca (λ_{\max}). Cabe mencionar que esta diferencia en los valores de ΔH no se había detectado de manera significativa en los datos presentados en el Capítulo I. Probablemente la mayor sensibilidad del calorímetro utilizado en este Capítulo permitió detectar la diferencia en ΔH .

Tabla 2: Propiedades térmicas y puntos críticos de la gelificación de A8 y A10.

	ΔH (J/g)	T_d (°C)	T_{onset} (°C)	T_{offset} (°C)
A8	$6,81 \pm 0,08a$	$78,24 \pm 0,12b$	$66,83 \pm 0,09b$	$82,88 \pm 0,04b$
A10	$6,22 \pm 0,07b$	$79,69 \pm 0,07a$	$71,19 \pm 0,22a$	$84,02 \pm 0,07^a$

	P_{EC-70} °C	$P_{10,3-70}$ °C	P_{EC-90} °C	$P_{10,3-90}$ °C
A8	$8,46 \pm 0,21 \text{ min}^\dagger$	$18,80 \pm 0,40 \text{ min}^\dagger$	$73,85 \pm 2,85a$ (°C)	$80,70 \pm 1,50a$ (°C)
A10	$66,90 \pm 0,40$ °C	$3,13 \pm 0,92 \text{ min}^\dagger$	$67,60 \pm 0,40b$ (°C)	$73,80 \pm 0,50b$ (°C)

Dispersiones proteicas al 10,5% p/p. Calorimetría y ciclos térmicos en reómetro (con *plateau* de 20 min a 70 o 90 °C) a 1 °C/min. Promedio \pm error estándar. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). († : tiempo durante el *plateau* a 70°C).

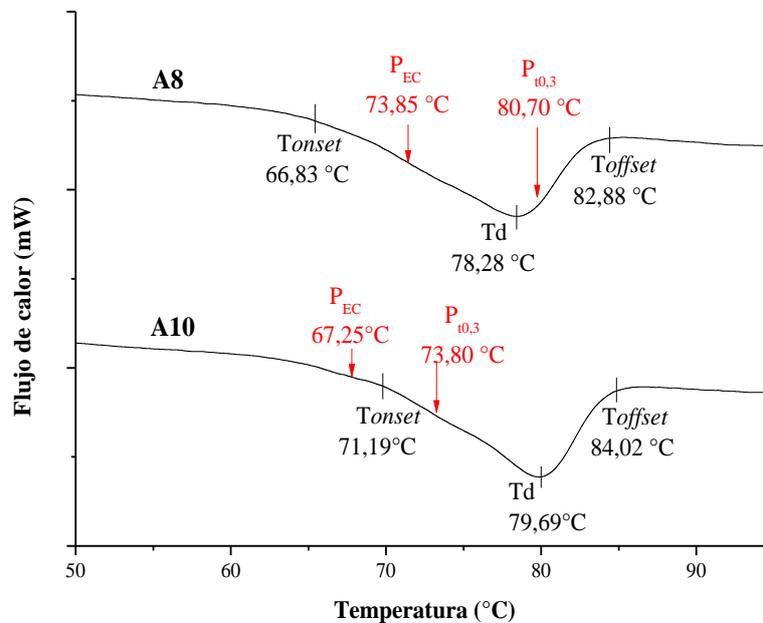


Figura 3: Propiedades térmicas y puntos críticos de la gelificación de dispersiones proteicas al 10,5% p/p de A8 y A10. Velocidad de calentamiento en calorímetro y en reómetro de 1 °C/min. Flujo calórico endotérmico hacia abajo.

Tanto en A8 como en A10 el P_{EC} se verificó a menor temperatura que la T_d (Figura 3). Para A10 el P_{EC} fue a $66,90 \pm 0,40$ °C en el ciclo hasta 70 °C y $67,60 \pm 0,40$ °C en el ciclo hasta 90 °C (sin diferencias significativas entre ellos, $p > 0,05$), mientras que su T_d fue $79,69 \pm 0,07$ °C. Por su parte, para A8 el P_{EC} ocurrió a los $8,46 \pm 0,21$ min del *plateau* a 70 °C (cuando el calentamiento llegó a esa temperatura) o a $73,85 \pm 2,85$ °C (cuando el calentamiento se extendió hasta 90 °C), y su T_d fue de $78,24 \pm 0,12$ °C (Tabla 2).

Otros autores informaron para, otras proteínas, diferencias con respecto a este comportamiento, con temperaturas de gelificación mayores a las T_d . Arntfield *et al.* (1989) informaron para ovoalbúmina 84 y 95 °C y para vicilina 79 y 95 °C, T_d y temperatura de gelificación, respectivamente. Speroni *et al.* (2010b) encontraron para aislado proteico de soja que el P_{EC} se verificaba cuando una de las globulinas que componen el aislado (β -conglucina) se encontraba completamente desnaturalizada y la otra (glicina) con un grado considerable de desnaturalización. Es notable que en A10 el P_{EC} ocurriera a menor temperatura que la *Tonset*. Este comportamiento de A10 sugiere que las modificaciones producidas durante la extracción proteica fueron suficientes para permitir que durante el calentamiento se establecieran interacciones atractivas entre polipéptidos, aún antes de que comenzara el proceso de desnaturalización evidenciado por DSC. Dado que en ambos aislados la gelificación comenzó antes de que se alcanzara un alto grado de desnaturalización, estos resultados sugieren que las proteínas de caupí presentan una importante capacidad de establecer interacciones entre sí.

El $P_{10,3}$ fue alcanzado durante el *plateau* en los ciclos que tuvieron temperatura máxima de 70 °C, en estos casos A8 requirió mayor tiempo que A10. Cuando los ciclos tuvieron temperatura máxima de 90 °C, ambos aislados alcanzaron el $P_{10,3}$ durante el calentamiento, A8 a temperatura mayor que su T_d y A10 a temperatura menor que su T_d (Tabla 2). Estos datos también sugieren que A10 presentó mayor capacidad de gelificación que A8, alcanzando un determinado grado de viscoelasticidad ($\tan \delta = 0,3$) habiendo recibido una menor cantidad de energía.

1.2. Comportamiento reológico

Las curvas de los módulos G' y G'' y de la temperatura en función del tiempo se muestran en un registro típico en la Figura 4. Las curvas de G' y G'' comenzaron con valores bajos (menores a 1 Pa) que disminuyeron hasta una temperatura de $52,36 \pm 0,68$ °C (cuando el calentamiento fue a 20 °C/min) a partir de esa temperatura los valores

aumentaron lentamente y durante dicho aumento exhibieron un máximo parcial a una temperatura de $74,28 \pm 0,34 \text{ }^\circ\text{C}$. Una vez alcanzado un determinado tiempo, que dependió de las características de cada muestra y de las condiciones del ensayo (velocidad de calentamiento y temperatura máxima), los valores aumentaron rápidamente (Figura 4a).

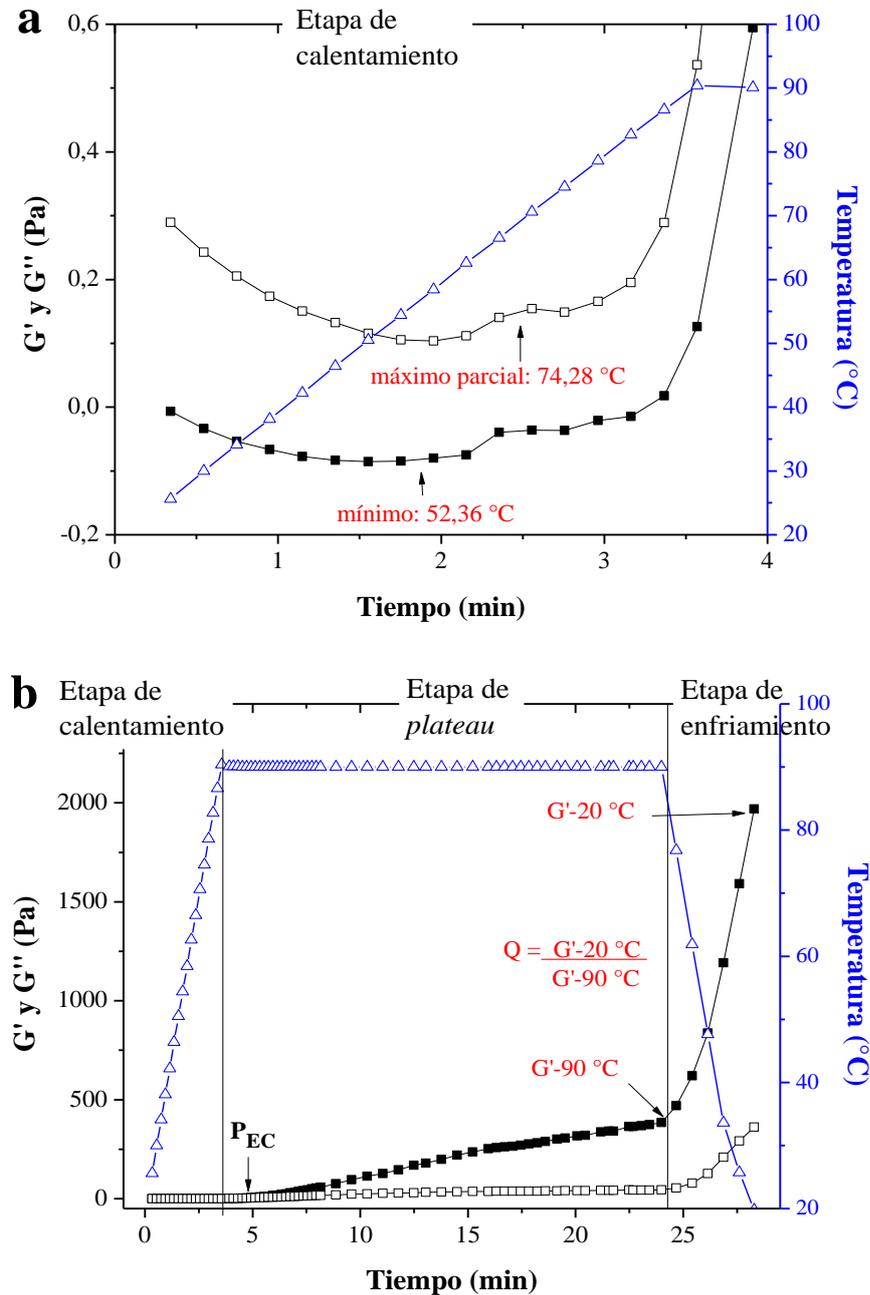


Figura 4: Módulos G' (■) y G'' (□) y temperatura (Δ) en función del tiempo de dispersión proteica al 10,5% p/p de A10. **a**) Etapa de calentamiento: Temperaturas de mínimos y máximos parciales de G' y G'' . **b**) Ciclo térmico completo: etapa de calentamiento de 20 a $90 \text{ }^\circ\text{C}$, a $20 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$; etapa de *plateau* de 20 min a $90 \text{ }^\circ\text{C}$, y etapa de enfriamiento de 90 a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, a $20 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.

El descenso de G' y G'' al principio del calentamiento se puede interpretar como una desestructuración del sistema viscoelástico inicial a causa de la destrucción de interacciones proteína-proteína que existían en las dispersiones. Este comportamiento fue también descrito para proteínas de soja por Ahmed *et al.* (2006) y de garbanzos por Ionescu *et al.* (2011). Renkema *et al.* (2001) y Renkema y van Vliet (2002) también describieron un máximo parcial en G' durante la gelificación de proteínas de soja que fue explicado como consecuencia de reordenamientos durante el calentamiento. Durante la etapa de *plateau* (y en algunos casos en la etapa de calentamiento) se llegó al P_{EC} y los módulos siguieron aumentando. Al comienzo del enfriamiento, los módulos aumentaron súbitamente. Se evaluó el crecimiento relativo de G' calculando el parámetro Q (G' al final del enfriamiento/ G' al inicio del enfriamiento) (Figura 4b).

1.2.1 Efecto de la concentración proteica

Se evaluaron los módulos G' y G'' y la $\tan \delta$ a 1 Hz al finalizar el *plateau* (90 °C) y al finalizar el enfriamiento (20 °C) (Figura 1 de la Sección 1.1.1. y Tabla 3). En todos los casos G' fue mayor a G'' y la $\tan \delta$ tuvo valores menores a la unidad. Una vez alcanzada la CC, la $\tan \delta$ tuvo valores entre 0,11 y 0,20, encontrándose una disminución significativa ($p < 0,05$) con el aumento de la concentración proteica (a 90 y a 20 °C) en A10, mientras que en A8 la $\tan \delta$ no fue función de la concentración proteica (Tabla 3). El aumento de la concentración proteica de las dispersiones de ambos aislados produjo un incremento significativo ($p < 0,05$) en G' , tanto a 90 como a 20 °C (Figura 1a y b).

El módulo elástico en función de la concentración proteica cumplió con la ley de la potencia ($G' = aC^b$). El exponente b refleja la estructura de la matriz, en términos de la naturaleza y empaquetamiento de los filamentos que la forman (Matsumura y Mori, 1996; Renkema y van Vliet, 2004). Al finalizar la etapa de calentamiento (90 °C) y la de enfriamiento (20 °C) ambos APC se ajustaron a este modelo ($R^2 > 0,88$) sin presentar diferencias significativas en el exponente b ($p > 0,05$), el cual tomó valores entre $8,57 \pm 0,05$ y $9,80 \pm 0,22$ (los valores individuales se presentan más adelante en las Tablas 7 y 13 de las Secciones 2.2.1. y 3.2.1. respectivamente). Tales valores del exponente b indican un comportamiento similar de las asociaciones y de la estructura de los filamentos de la matriz, aunque diferentes fuerzas fisicoquímicas podrían predominar en cada tipo de gel. Estos resultados son similares a los de Renkema y van Vliet (2004) y Sun y Arntfield (2010), quienes analizaron la gelificación de proteínas de reserva de soja ($b = 10,3$) y de

arveja ($b = 6,2$), respectivamente. Sin embargo, en proteínas de origen animal con gran capacidad de gelificación como gelatina o proteínas miofibrilares de pescado los valores de b encontrados fueron 2,05 y 1,97 respectivamente (Kumagai *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2013).

A cada concentración ensayada, A10 presentó mayor G' que A8, tanto a 90 como a 20 °C, excepto en la dispersión al 5,5% p/p donde no se logró la gelificación de ningún aislado (Figura 8). Los mayores valores de G' fueron 2742 ± 90 y 5264 ± 350 Pa para A8 y A10 respectivamente al 12,0% p/p, al finalizar el ciclo (Figura 1b). Al final del *plateau* a 90 °C, las $\tan \delta$ de A10 fueron menores que las de A8 (Tabla 3). Los valores altos de G' y bajos de $\tan \delta$ indican que la componente elástica de A10 se vio favorecida con respecto a la de A8, este comportamiento sugiere que A10 tuvo más habilidad que A8 para establecer interacciones promovidas por el calor (como las hidrofóbicas y los puentes disulfuro (Shimada y Cheftel, 1989), lo que está en acuerdo con su mayor hidrofobicidad superficial (Sección 2.3. del Capítulo I).

Tabla 3: Viscoelasticidad ($\tan \delta$) y Q en función de la concentración proteica de dispersiones de A8 y A10.

Concentración (% p/p)		$\tan \delta$ -90 °C	$\tan \delta$ -20 °C	Q
A8	5,5	$0,62 \pm 0,01b$	$0,50 \pm 0,08a$	$2,1 \pm 0,2e$
	7,5	$0,67 \pm 0,01a$	$0,46 \pm 0,13b$	$2,7 \pm 0,1de$
	9,0	$0,17 \pm 0,02d^*$	$0,19 \pm 0,00c^*$	$5,3 \pm 0,8bc$
	10,5	$0,18 \pm 0,00d$	$0,19 \pm 0,00c$	$5,4 \pm 0,5b$
	12,0	$0,15 \pm 0,01def$	$0,18 \pm 0,00c$	$4,6 \pm 0,0bcd$
A10	5,5	$0,56 \pm 0,02c$	$0,47 \pm 0,18a$	$3,4 \pm 1,4cde$
	7,5	$0,15 \pm 0,00de^*$	$0,20 \pm 0,00c^*$	$7,3 \pm 0,8a$
	9,0	$0,13 \pm 0,01ef$	$0,20 \pm 0,00c$	$7,6 \pm 0,5a$
	10,5	$0,12 \pm 0,00ef$	$0,18 \pm 0,00c$	$5,3 \pm 0,3b$
	12,0	$0,11 \pm 0,00f$	$0,17 \pm 0,00c$	$4,4 \pm 0,4bcd$

Ciclos térmicos en reómetro con velocidad de calentamiento y enfriamiento de 20 °C/min, con *plateau* de 20 min a 90 °C y etapa de enfriamiento hasta 20 °C. Promedio \pm error estándar. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). (*: CC).

Durante la etapa de enfriamiento (de 90 a 20 °C), las interacciones entre las proteínas se siguieron estableciendo, principalmente las de tipo puente de hidrógeno y electrostáticas, produciendo un aumento significativo de ambos módulos en todas las concentraciones ensayadas y en ambos aislados. Los valores de $\tan \delta$ en A10 aumentaron y en A8 no presentaron diferencias significativas. El hecho de que la $\tan \delta$ aumentara durante el enfriamiento en A10 indica que el componente viscoso (G'') aumentó relativamente más que el componente elástico durante esta etapa, sugiriendo que los puentes de hidrógeno representaron interacciones importantes para el componente viscoso en A10 (Tabla 3). Avanza *et al.* (2005) reportaron aumento de $\tan \delta$ a causa del enfriamiento en geles de aislado proteico de amaranto. El parámetro Q refleja el crecimiento relativo de G' en la etapa de enfriamiento. A todas las concentraciones en que A8 formó gel (a partir de su CC) y a las concentraciones mayores en A10 (10,5 y 12,0% p/p), G' aumentó entre 4,6 y 5,3 veces su valor durante el enfriamiento, sin diferencias significativas ($p > 0,05$). Los mayores valores de Q se encontraron en A10, en los geles obtenidos con las menores concentraciones proteicas (7,5 y 9,0% p/p), donde G' aumentó más de 7 veces su valor (Tabla 3). Este efecto podría deberse a que a menores concentraciones se hubiera formado una matriz más abierta, con sitios reactivos disponibles para interaccionar y seguir estabilizando la estructura durante la etapa de enfriamiento.

1.2.2. Efecto de la temperatura de *plateau*

El módulo G' y la $\tan \delta$ a 1 Hz fueron evaluados en geles obtenidos al 10,5% p/p en ambos aislados, tanto al final del *plateau* como al final del ciclo (20 °C) en los ciclos con temperaturas máximas de *plateau* a partir de 70 °C. No se evaluaron estos parámetros en los ciclos con temperatura máxima de 50 y 60 °C porque las dispersiones no llegaron a gelificar (Figura 2 y Tabla 1 de la Sección 1.1.2.). Al finalizar el *plateau* de cada ciclo, los valores de G' de A10 fueron siempre mayores a los de A8. Con respecto al efecto de la temperatura de *plateau*, en A8, los mayores valores de G' se alcanzaron a 80 y 90 °C, mientras que A10 tuvo un máximo a 80 °C (Figura 2a). Estos datos son acordes a lo propuesto por Myers (1990), quien sostiene que las interacciones hidrofóbicas presentan un rango de temperatura en que su magnitud es máxima (60 - 80 °C). En nuestro caso el máximo se desplazaría hacia las mayores temperaturas de este rango ya que los APC tuvieron T_d cercanas a 80 °C. De esta manera, durante el *plateau* a 80 °C las proteínas alcanzaron un alto grado de desnaturalización que permitió exponer sitios hidrofóbicos.

Las diferencias en los valores de G' entre A8 y A10 sugieren que existe un compromiso entre al menos tres factores: el grado de desnaturalización inicial, el grado de desnaturalización alcanzado durante las fases de calentamiento y *plateau* y el efecto de la temperatura sobre las interacciones hidrofóbicas. El balance entre estos factores resultaría en que los polipéptidos de A10, a una temperatura máxima de 80 °C lograron interactuar entre sí más que a otras temperaturas y más que los polipéptidos de A8. La $\tan \delta$ fue mayor a 70 °C que a las mayores temperaturas ensayadas, sin encontrarse diferencias significativas entre los valores de $\tan \delta$ en el rango 80 - 95 °C (Tabla 4). Esto sugiere que haber superado la T_d permitió la exposición de más sitios de interacción entre polipéptidos, logrando la formación de una estructura más elástica. Para cada temperatura A10 mostró menores valores de $\tan \delta$ que A8 (Tabla 4).

Tabla 4: Viscoelasticidad ($\tan \delta$) y Q en función de la temperatura de *plateau* de dispersiones de A8 y A10.

Temperatura de <i>plateau</i> (°C)	$\tan \delta$ -al final del <i>plateau</i>	$\tan \delta$ -20 °C	Q	
A8	70	0,38 ± 0,04a	0,28 ± 0,01a	7,1 ± 0,7b
	80	0,21 ± 0,02b	0,19 ± 0,01d	5,1 ± 0,1b
	90	0,16 ± 0,02b	0,19 ± 0,01cd	6,0 ± 0,2b
	95	0,16 ± 0,00b	0,21 ± 0,01b	13,1 ± 4,5a
A10	70	0,18 ± 0,01b	0,19 ± 0,00bc	4,9 ± 0,5b
	80	0,11 ± 0,01c	0,16 ± 0,00d	3,6 ± 0,2c
	90	0,12 ± 0,01c	0,18 ± 0,00cd	5,0 ± 0,1b
	95	0,12 ± 0,00c	0,18 ± 0,01cd	7,5 ± 0,8b

Dispersiones proteicas al 10,5% p/p. Ciclos térmicos en reómetro con velocidad de calentamiento y enfriamiento de 20 °C/min, con *plateau* de 20 min a temperatura variable y etapa de enfriamiento hasta 20 °C. Promedio ± error estándar. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Una vez terminado el ciclo (20 °C), tanto en A8 como en A10, se encontraron los mayores valores de G' en el rango de 80 - 95 °C, entre 888 ± 418 a 1655 ± 314 Pa sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las temperaturas y los aislados, excepto en A10 a

80 °C donde se manifestó un máximo en G' que lo diferenció de los otros (2825 ± 238 Pa, $p < 0,05$). Los valores de G' de A10 fueron mayores a los de A8 en los ciclos con temperaturas máximas de 70 y 80 °C, pero no se encontraron diferencias significativas a 90 o 95 °C (Figura 2b). Este comportamiento sugiere que las interacciones que se establecieron durante el enfriamiento (principalmente puentes de hidrógeno) cancelaron gran parte de las diferencias observadas al final del *plateau* entre A8 y A10, en los ciclos con temperatura máxima de 90 y 95 °C. Al analizar los valores de $\tan \delta$ (al finalizar el ciclo) en A8 se encontró una diferencia entre 70 °C y las mayores temperaturas, mientras que en A10 no se observaron diferencias en el rango 70 - 95 °C (Tabla 4). Uruakpa y Arntfield (2005) explican que los valores absolutos del módulo elástico son indicativos de la fuerza de la red intermolecular, mientras que los valores de la $\tan \delta$ son indicativos del carácter viscoelástico. Arntfield *et al.* (1990) proponen, al estudiar la gelificación de vicilina, que valores altos de $\tan \delta$ pueden deberse tanto a la existencia de un sistema con predominio de proteína agregada en forma desordenada como a sistemas con predominio de proteína soluble, mientras que valores bajos de $\tan \delta$ indican la existencia de un buen grado de entrecruzamiento en la red. Al finalizar los ciclos, el valor más bajo de $\tan \delta$ se encontró en A10 para el ciclo de 80 °C, en el cual habíamos encontrado el mayor valor de G' , atribuyendo a un predominio de interacciones hidrofóbicas. Al analizar los valores de Q (crecimiento relativo de G' durante el enfriamiento), el menor valor se encontró en A10 en el ciclo de 80 °C, indicando menor contribución de enlaces puente de hidrógeno. A su vez, los mayores valores de Q se detectaron en los ciclos de 95 °C (Tabla 4), condición en la cual no fueron favorecidas las interacciones hidrofóbicas, pero si los puentes de hidrógeno durante la etapa de enfriamiento, logrando así alcanzar valores altos de elasticidad comparables con la de los otros ciclos. Estos resultados indican que la variación de la temperatura máxima del ciclo tuvo efectos importantes en las características de los geles. Por debajo o cerca de la Td (70 y 80 °C) se detectaron diferencias debidas al estado inicial de cada aislado, mientras que a mayores temperaturas (90 y 95 °C), las diferencias entre A8 y A10, en términos de elasticidad de los geles (G'), se cancelaron al final del ciclo, pero la viscoelasticidad ($\tan \delta$) dependió del tipo de interacciones que se promovieron. Este comportamiento explicaría por qué en la Sección 3.4. del Capítulo I no se habían detectado diferencias en la LGC de A8 y A10 cuando la gelificación se había realizado por un TT en un baño de agua hirviendo (temperaturas entre los 95 y 100 °C) por 30 min.

Similares efectos de la temperatura máxima de los ciclos de gelificación térmica sobre las propiedades reológicas de los geles obtenidos fueron comunicados por otros autores. Avanza *et al.* (2005) informaron que a temperaturas mayores a 70 °C obtuvieron dispersiones elásticas de aislado proteico de amaranto con $\tan \delta < 0,15$, atribuyendo este bajo valor al predominio de interacciones hidrofóbicas, la máxima elasticidad fue obtenida al calentar a 95 °C por ser la temperatura cercana a la Td de las globulinas 11S y P de dichos aislados. En geles de aislados proteicos de soja a pH 8, G' aumentó entre 70 y 80 °C y se mantuvo constante para temperaturas más altas, coincidiendo con la desnaturalización de la fracción 7S (Puppo y Añón, 1998a).

1.2.3. Efecto de la velocidad de calentamiento y enfriamiento

Dado que tanto la desnaturalización como la gelificación son procesos con control cinético (Donovan y Beardslee, 1975; Le Bon *et al.*, 1999), resultó de interés evaluar los efectos de la velocidad de calentamiento y enfriamiento. En esta Sección se aplicaron distintas velocidades (1 o 20 °C/min) en el proceso de gelificación térmica de dispersiones al 10,5% p/p de A8 y A10 en ciclos con temperatura máxima de 70 o 90 °C (Figura 5). Durante las etapas de calentamiento y *plateau*, la gelificación depende principalmente de la cinética de desnaturalización proteica. Las interacciones pueden establecerse y los polipéptidos pueden reordenarse cuando las proteínas alcanzan un cierto grado de desnaturalización. Durante el enfriamiento se suman interacciones y se producen reordenamientos pero sin cambios importantes en el grado de desnaturalización alcanzado en las etapas previas. En la Sección 1.1.3. se encontró que la disminución de la velocidad de calentamiento y enfriamiento había disminuido el tiempo o temperatura para llegar a los puntos críticos de la gelificación (P_{EC} y $P_{10,3}$). De la misma forma, a menor velocidad de calentamiento, el comportamiento reológico mejoró ya que se obtuvieron mayores G' y menores $\tan \delta$. Este efecto se observó en los ciclos con *plateau* a 90 °C para los dos aislados y en el de 70 °C para A10, al evaluar los parámetros tanto al finalizar el *plateau* como el ciclo (Figura 5a y b y Tabla 11). Este efecto fue importante ya que los incrementos relativos de G' se encontraron entre 2,5 y 4,0 veces y las $\tan \delta$ fueron de 0,16 y 0,14 al finalizar los ciclos con *plateau* a 70 y 90 °C, respectivamente, para los dos aislados. Estos resultados están de acuerdo con lo planteado por Sun y Arntfield (2010), quienes sostienen que a menores velocidades de calentamiento y enfriamiento las proteínas tienen más tiempo de reordenarse y alinearse pudiendo entrelazarse más efectivamente.

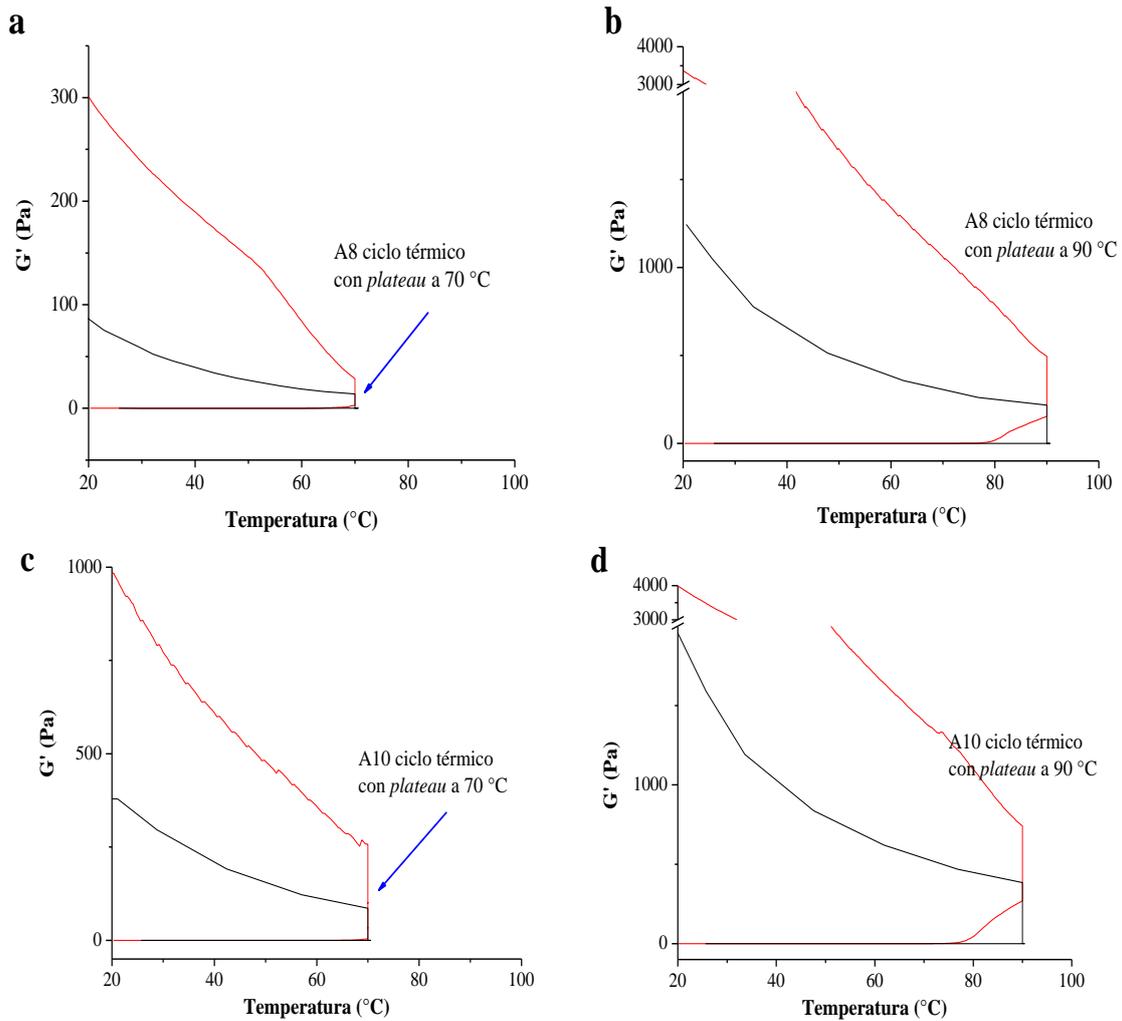


Figura 5: Módulo G' en función de la temperatura, a diferentes velocidades de calentamiento y enfriamiento (20 °C/min (línea negra) y 1 °C/min (línea roja), de dispersiones al 10,5% p/p de A8 (a y b) y A10 (c y d), con *plateau* de 20 min a 70 (a y c) o 90 °C (b y d).

Por otro lado, en A8 al finalizar el *plateau* de 70 °C, la velocidad de calentamiento no influyó sobre los valores de G' y $\tan \delta$ ya que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los ciclos a 1 o 20 °C/min (Figura 5a, flecha azul y Tabla 5). En cambio al finalizar el ciclo, el efecto de la velocidad de enfriamiento produjo el aumento esperado de G' y la disminución de $\tan \delta$ (como se había encontrado en el ciclo de 90 °C y en el aislado A10). Esto se debió a que el valor de Q fue significativamente mayor que en los demás ciclos ($p < 0,05$; Tabla 5). Esto sugiere que en las condiciones menos propicias de gelificación (A8 a 70 °C), ni siquiera el calentamiento lento favoreció las interacciones hidrofóbicas en A8, y el predominio de interacciones al finalizar el ciclo correspondería a los puentes de hidrógeno generados durante la etapa de enfriamiento, reforzando la idea

que se presentó en la Sección 1.1.2. al evaluar los P_{EC} y $P_{10,3}$ de ambos aislados en el ciclo con *plateau* a 70 °C.

Tabla 5: Módulo G' , viscoelasticidad ($\tan \delta$) y Q a diferentes velocidades de calentamiento y enfriamiento de dispersiones de A8 y A10, ciclos térmicos hasta 70 o 90 °C.

	Al finalizar el <i>plateau</i>		Al finalizar el ciclo		
	G' (Pa)	$\tan \delta$	G' (Pa)	$\tan \delta$	Q
A8 ciclo a 70 °C					
1 °C/min	20 ± 4e	0,26 ± 0,01a	320 ± 38d	0,16 ± 0,00c	15,9 ± 1,1a
20 °C/min	12 ± 2e	0,38 ± 0,06a	84 ± 4e	0,28 ± 0,01a	7,0 ± 0,9b
A8 ciclo a 90 °C					
1 °C/min	697 ± 86b	0,10 ± 0,01c	4603 ± 737a	0,14 ± 0,01c	6,6 ± 0,2b
20 °C/min	193 ± 34d	0,16 ± 0,02b	1160 ± 245b	0,19 ± 0,00b	5,9 ± 0,2b
A10 ciclo a 70 °C					
1 °C/min	396 ± 96c	0,18 ± 0,02b	858 ± 172c	0,16 ± 0,00c	2,5 ± 1,7c
20 °C/min	72 ± 19d	0,18 ± 0,01b	345 ± 47d	0,19 ± 0,00b	4,8 ± 0,6bc
A10 ciclo a 90 °C					
1 °C/min	1111 ± 28a	0,08 ± 0,00c	5860 ± 67a	0,14 ± 0,00c	5,2 ± 0,1b
20 °C/min	365 ± 79c	0,12 ± 0,01b	1950 ± 600b	0,18 ± 0,00b	5,2 ± 0,5b

Dispersiones proteicas al 10,5% p/p. Ciclos térmicos en reómetro con *plateau* de 20 min a 70 o 90 °C y etapa de enfriamiento hasta 20 °C. Promedio ± error estándar. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Al analizar las curvas de G' y G'' en función del tiempo se observó que la tasa de crecimiento de los módulos fue diferente para cada velocidad de enfriamiento. En la Figura 6 se observa que a 1 °C/min la tasa de crecimiento aumentó paulatinamente, sin encontrarse el cambio abrupto observado a 20 °C/min (Figura 4b, Sección 1.2.). Esta diferencia probablemente se debió a que cuando el calentamiento fue lento las proteínas pasaron suficiente tiempo expuestas a altas temperaturas para desarrollar abundantes interacciones hidrofóbicas. De esta manera se formaría un ordenamiento espacial que condicionaría la posterior formación de puentes de hidrógeno durante el enfriamiento.

También pudo darse que a la menor velocidad de enfriamiento distintos mecanismos ocurrieran simultáneamente, resultando curvas más suaves. En este sentido Sun y Arntfield (2011) encontraron que cuando las velocidades de calentamiento y enfriamiento eran altas, en los primeros minutos del enfriamiento, el crecimiento de G' era más rápido que en los últimos minutos del enfriamiento. Estos autores postularon que con altas velocidades, la red se estaría todavía formando durante la primera parte del enfriamiento, mientras que para velocidades bajas, la red se formaría durante el calentamiento y solo se reforzaría durante el enfriamiento. En nuestros ensayos, la matriz tridimensional se formaría durante el calentamiento y el *plateau*, por lo que durante el enfriamiento se produciría un reforzamiento, lo que se reflejaría en un crecimiento constante de G' durante el enfriamiento.

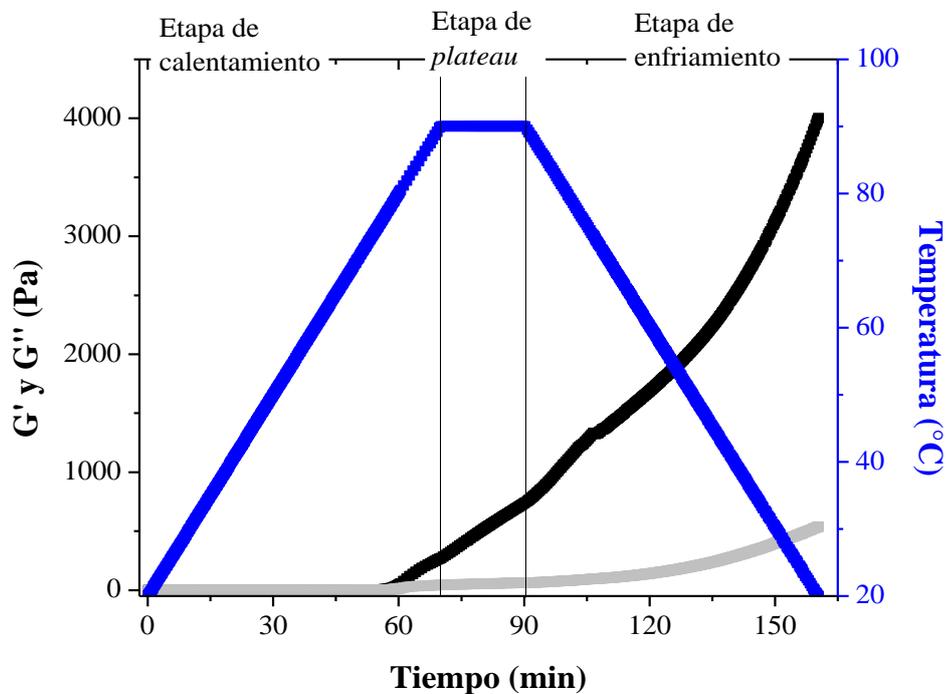


Figura 6: Módulos G' (■) y G'' (■) y temperatura (■) en función del tiempo, de dispersión de A10 al 10,5% p/p. Ciclo térmico en reómetro con velocidad de calentamiento y enfriamiento de 1 °C/min.

Camou *et al.* (1989) trabajaron con geles de proteínas cárnicas y también encontraron que el aumento de la velocidad de calentamiento generó geles menos fuertes y con menor cantidad de proteína involucrada en la matriz tridimensional. Gossett *et al.* (1984) postularon que el efecto de la velocidad de calentamiento está condicionado por las diferencias entre las velocidades de desnaturalización y agregación, geles más elásticos se obtendrían cuando la agregación es más lenta que la desnaturalización, lo que permitiría a

los polipéptidos desnaturalizados disponer de más tiempo para reorientarse y poder establecer más interacciones. Por su parte, O'Kane *et al.* (2005) quienes trabajaron con proteínas de arveja, indican que el efecto de la velocidad de enfriamiento depende de las características de la matriz formada durante el calentamiento, la presencia de puentes disulfuro disminuiría la libertad y flexibilidad necesarias para el reordenamiento de las cadenas polipeptídicas y no se aprovecharía el mayor tiempo de enfriamiento para formar un mayor número de puentes de hidrógeno. En nuestro caso la disminución de la velocidad probablemente permitió reordenamientos en todas las etapas del ciclo térmico.

Cuando se determinó la LGC en la Sección 3.4. del Capítulo I no se controló la velocidad de calentamiento y enfriamiento del TT, pero fueron mayores a las estudiadas en este Capítulo dados el volumen de muestra, el tipo de recipiente y los medios de calefacción y enfriamiento empleados (1mL de dispersión proteica en tubo eppendorf sometido a baño en agua en ebullición y luego enfriado bajo corriente de agua fría). Esto provocó que fuera necesaria mayor concentración de proteína para llegar a un aspecto de gel (determinado visualmente).

2. Efectos del pre-tratamiento con APH en el proceso térmico de gelificación de APC

2.1. Condiciones críticas de gelificación

El pre-tratamiento con APH se aplicó a las dispersiones proteicas durante 5 min a 400 o 600 MPa previamente a las medidas reológicas. Las condiciones en el reómetro incluyeron ciclos térmicos con velocidad de calentamiento y enfriamiento de 20 °C/min, variando la concentración proteica o la temperatura de *plateau*, como se trabajó anteriormente. Se evaluaron los mismos parámetros del proceso de gelificación térmica definidos en la Sección 1.1. En la mayoría de las muestras el P_{EC} no se pudo determinar ya que luego del pre-tratamiento con APH las dispersiones presentaban $G' > G''$.

2.1.1. Concentración Crítica

El pre-tratamiento a 400 o 600 MPa de las dispersiones de APC indujo un aumento de la CC, siendo de 10,5% p/p para A8 y de 9,0% p/p para A10. Cuando la formación de la matriz se analizó al final del *plateau* (90 °C) se encontró que A8 al 10,5% p/p y A10 al 9,0% p/p tuvieron tan δ menores, pero muy cercanas a 0,3 (valor arbitrario de nuestra

definición de CC), mientras que al completar el ciclo térmico (20 °C) la $\tan \delta$ disminuyó (Tabla 8, ver más adelante en la Sección 2.2.1. sobre el comportamiento reológico). A bajas concentraciones proteicas el TAPH indujo desnaturalización y formación de agregados estabilizados por puentes disulfuro (en dispersiones al 1,0% p/v, Sección 2.1.1. del Capítulo I). Es probable que los puentes disulfuro hayan disminuido la flexibilidad de los polipéptidos reduciendo durante el TT su capacidad de formar una matriz tridimensional, bloqueando sitios reactivos, disminuyendo la habilidad para establecer interacciones, y por lo tanto requiriéndose mayor concentración proteica para formar un gel.

2.1.2. Temperatura crítica o tiempo crítico de gelificación. Relación con propiedades térmicas.

Se observó en las muestras pre-tratadas con APH un descenso en la TC de 70 a 60 °C cuando el pre-tratamiento fue a 400 MPa y de 70 a 50 °C cuando se aplicaron 600 MPa, para ambos aislados, tanto al finalizar el *plateau* como al finalizar el ciclo térmico (Tabla 9, ver más adelante en la Sección 2.2.2. sobre el comportamiento reológico). A concentraciones mayores a la CC (10,5% p/p para A8 y 9,0% p/p para A10), las modificaciones inducidas por las APH permitieron que los polipéptidos comenzaran a interactuar a menor temperatura y lograran generar matrices con $\tan \delta < 0,3$. El pre-tratamiento con APH produjo dispersiones proteicas con mayor componente elástico que viscoso, por lo cual el P_{EC} no se pudo determinar para evaluar el inicio de la gelificación. El $P_{10,3}$, parámetro arbitrario definido en la Sección 1., nos permitió evaluar el efecto de la temperatura máxima de *plateau* en el proceso de gelificación (Tabla 6). Se encontró que incluso a la menor temperatura ensayada (50 °C) se verificó este punto, para las muestras tratadas con 600 MPa. En todos los casos de muestras pre-tratadas el $P_{10,3}$ ocurrió durante el *plateau*. En los ciclos con temperaturas de *plateau* hasta 80 °C inclusive, el aumento de la temperatura produjo una disminución del tiempo para llegar al $P_{10,3}$ con respecto a las muestras no presurizadas (Tabla 6). Cuando la temperatura máxima fue 90 o 95 °C, no se pudo encontrar un patrón sencillo en el comportamiento.

Estos resultados indican que las modificaciones inducidas por APH podrían modificar la habilidad de establecer interacciones favorecidas por el calentamiento en las proteínas de caupí. La desnaturalización previa al TT fue probablemente el factor preponderante en este efecto. Los pre-tratamientos con APH a 400 MPa no modificaron

significativamente ($p > 0,05$) las Td en ambos aislados (A8 = $79,15 \pm 0,09$ °C y A10 = $79,39 \pm 0,30$ °C) pero provocaron un alto grado de desnaturalización (A8 = $87,62 \pm 2,03$ y A10 = $86,69 \pm 1,46\%$). A 600 MPa el grado de desnaturalización fue 100%, sin diferencias entre A8 y A10. En la Sección 2.4. del Capítulo I el GD encontrado luego de estos tratamientos fue menor (66%), sin diferencias significativas entre los aislados ni entre los niveles de presión aplicados. La diferencia pudo deberse a la menor concentración proteica utilizadas durante los TAPH correspondientes al Capítulo I.

Tabla 6: $P_{10,3}$ de A8 y A10, sin tratar o pre-tratadas con APH a diferentes temperaturas de *plateau*.

	Temperatura de <i>plateau</i> (°C)	$P_{10,3}$ (min)		
		0,1 MPa	400 MPa	600 MPa
A8	50	∞	∞	$16,98 \pm 0,30b$
	60	∞	$8,94 \pm 0,08de$	$7,52 \pm 0,46e$
	70	$41,8 \pm 9,8$ °C [♦]	$2,26 \pm 0,11fg$	$3,09 \pm 0,33fg$
	80	$13,48 \pm 1,43cb$	$2,41 \pm 0,38fg$	$3,68 \pm 0,40fg$
	90	$10,15 \pm 0,90cd$	$19,66 \pm 0,34a$	$4,28 \pm 0,31f$
	95	$7,43 \pm 0,20e$	$15,07 \pm 2,0b$	$17,22 \pm 0,36ab$
A10	50	∞	∞	$15,29 \pm 0,30b$
	60	∞	$11,78 \pm 1,26c$	$6,83 \pm 0,24e$
	70	$13,40 \pm 0,73cb$	$3,56 \pm 0,61fg$	$2,51 \pm 0,50fg$
	80	$4,69 \pm 0,19f$	$2,06 \pm 0,10fg$	$1,73 \pm 0,52g$
	90	$3,74 \pm 0,44f$	$4,08 \pm 0,21fg$	$2,08 \pm 0,95fg$
	95	$4,29 \pm 0,29f$	$8,42 \pm 2,82de$	$10,2 \pm 0,08cd$

Dispersiones proteicas al 10,5% p/p. Ciclos térmicos en reómetro con velocidad de calentamiento y enfriamiento de 20 °C/min, *plateau* de 20 min a temperatura variable. Promedio \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). (∞ : no se alcanzó el $P_{10,3}$ a ningún tiempo del ensayo; [♦]: temperatura durante la etapa de enfriamiento).

Cuando la gelificación se produjo a partir de proteínas en estado nativo, el calor aportado a la dispersión en primer lugar desnaturizó las proteínas y posteriormente éstas pudieron asociarse a través de distintas interacciones. Dado que en estos ensayos se aplicó una velocidad de calentamiento relativamente alta (20 °C/min) la existencia de estos dos pasos pudo tener consecuencias importantes en la cinética de gelificación de los APC no pre-tratados. De manera diferente, las muestras pre-tratadas ya presentaban un alto grado de desnaturización por lo que ya se encontraban en condiciones de interactuar. Como se observó en la Sección 2.3. del Capítulo I, las APH aumentaron la hidrofobicidad superficial de las proteínas desnaturizadas, lo que aumentó su habilidad para formar interacciones durante el calentamiento. El mayor tiempo requerido para el $P_{10,3}$ a 95 °C sería consecuencia de que las interacciones hidrofóbicas se ven más favorecidas en el rango de 60 - 80 °C que a temperaturas tan altas como 95 °C (Myers, 1990).

Similares efectos se reportaron para aislado proteico de soja, ya que la temperatura a la cual se consideró que se inició la gelificación disminuyó de 84, °C a 74, °C y 63,8 °C cuando las muestras fueron pre-tratadas a 200 y 400 MPa respectivamente (Speroni *et al.*, 2010). En ese trabajo los autores definieron el inicio de la gelificación como el punto en que G' comenzaba a crecer considerablemente, ya que al inicio del tratamiento térmico las dispersiones pre-tratadas con APH también presentaban G' mayor a G'' .

2.2. Comportamiento reológico

Cuando se analizaron las curvas de G' y G'' en función del tiempo de muestras pre-tratadas con APH se observó un aumento en los valores iniciales de estos módulos (con respecto a las no presurizadas), generando dispersiones con predominio del componente elástico sobre el viscoso (Figura 7a). Este resultado sugiere que la desnaturización provocada por el tratamiento con APH permitió reforzar la estructura de la matriz inicial y está en acuerdo con lo propuesto por Boonyaratanakornkit *et al.*, (2002) quienes sostienen que las APH favorece el establecimiento de interacciones como los puentes de hidrógeno. A medida que la temperatura aumentó, los módulos sufrieron una disminución hasta $53,56 \pm 0,78$ °C (temperatura de mínimo (Figura 7a), sin diferencias significativas ($p > 0,05$) con las muestras no tratadas), comportamiento explicable por el desensamblado de interacciones bajo control entálpico como puentes de hidrógeno o electrostáticas. A partir de los 53,56 °C el favorecimiento de las interacciones hidrofóbicas provocó un aumento de los valores de los módulos. El máximo parcial detectado durante el calentamiento se corrió

hacia mayores temperaturas ($86,95 \pm 0,95 \text{ }^\circ\text{C}$) en las muestras tratadas a 400 o 600 MPa (Figura 7a). El comienzo del enfriamiento aumentó súbitamente la tasa de crecimiento de los módulos, como también se había observado en las muestras no tratadas (Figura 7b).

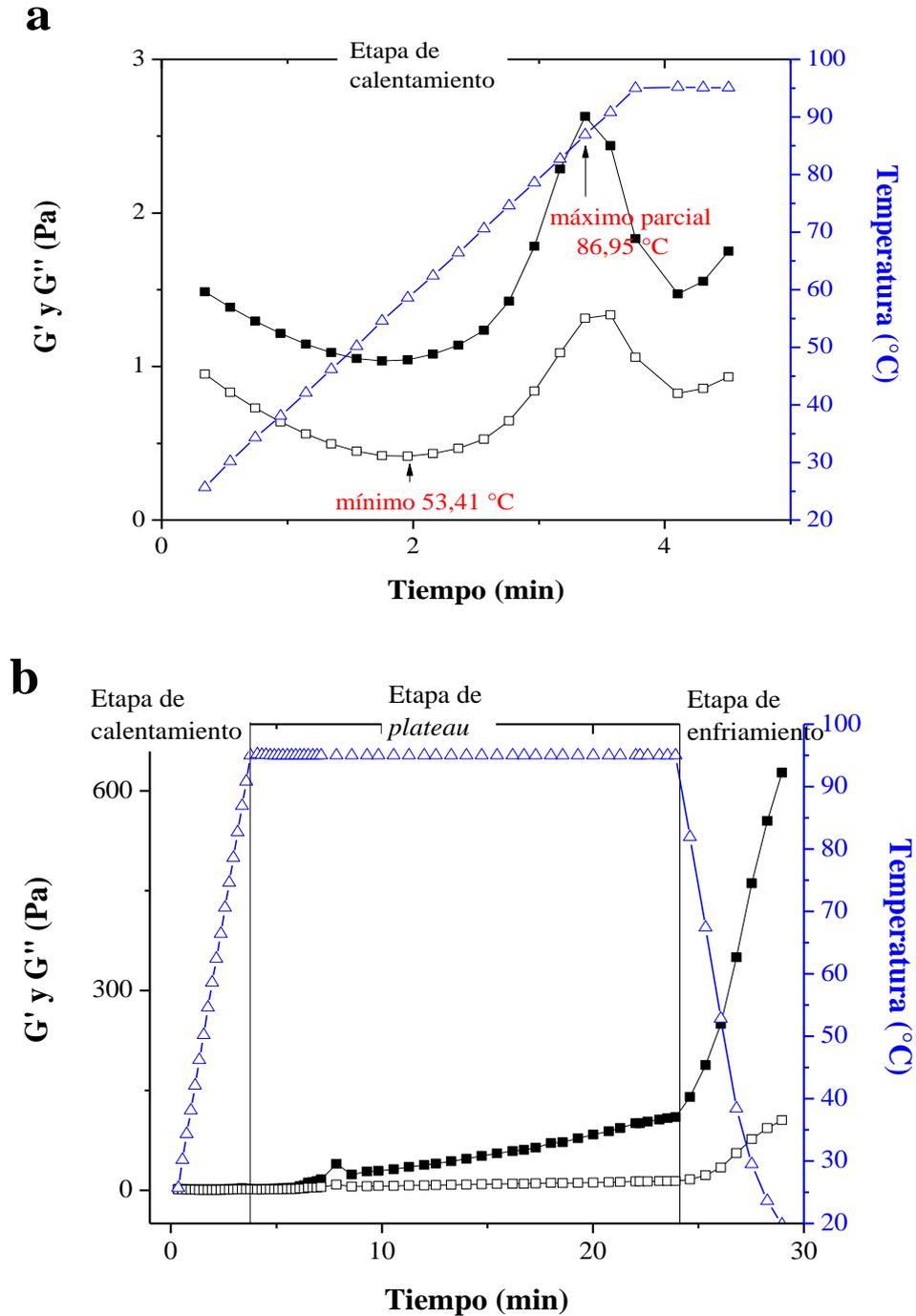


Figura 7: Módulos G' (■) y G'' (□) y temperatura (Δ) en función del tiempo para una dispersión proteica al 10,5% p/p de A10 pre-tratada 5 min a 600 MPa. **a)** Etapa de calentamiento: Temperaturas de mínimos y máximos parciales de G' y G'' . **b)** Ciclo térmico completo: etapa de calentamiento de 20 a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$; etapa de *plateau* de 20 min a $95 \text{ }^\circ\text{C}$, y etapa de enfriamiento de 95 a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.

Speroni *et al.* (2010b) también observaron en dispersiones de aislado proteico de soja aumento del módulo elástico por el pre-tratamiento con APH y posterior disminución del mismo al inicio de la etapa de calentamiento.

2.2.1. Efecto de la concentración proteica

Como se mencionó anteriormente (Sección 2.1.1.), el pre-tratamiento con APH aumentó la CC de gelificación de cada aislado. En la Figura 8 se muestran los valores de G' de las dispersiones sin pre-tratamiento (0,1 MPa) y pre-tratadas (400 o 600 MPa). Al 5,5 y 7,5% p/p los valores de G' de las dispersiones pre-tratadas eran pequeños, incluso menores a los correspondientes a las dispersiones sin pre-tratamiento. A la CC de las muestras pre-tratadas (10,5% p/p para A8 y 9,0% p/p para A10) el valor de G' no varió significativamente ($p > 0,05$) con respecto a las no pre-tratadas. Sin embargo, para concentraciones mayores a la CC (12,0% p/p, en A8 o 10,5 y 12,0% p/p en A10) el valor de G' fue mayor en las dispersiones pre-tratadas a 400 MPa, efectos que se encontraron tanto al finalizar el *plateau*, como al finalizar el enfriamiento (Figura 8a y b). Por otro lado, con el pre-tratamiento a 600 MPa se encontró que los valores de G' fueron menores a los correspondientes pre-tratados a 400 MPa en A10 ($p < 0,05$), mientras que en A8 fueron menores a los correspondientes no pre-tratados ($p < 0,05$) (Figura 8a y b). Este efecto podría estar relacionado con el grado de desnaturalización alcanzado con cada nivel de presión. La desnaturalización parcial (400 MPa) mejoraría la elasticidad del gel, pero la desnaturalización completa (600 MPa), no la favorecería en A10 y la perjudicaría en A8. Estos resultados estarían de acuerdo con los encontrados en la Sección 3.4. del Capítulo I donde los aislados tratados a 200 y 400 MPa presentaron menor LGC que los aislados sin tratar o tratados a 600 MPa.

Al evaluar la variación de G' en función de la concentración proteica (C), las dispersiones pre-tratadas con APH también se ajustaron a la ley de la potencia ($G' = aC^b$, con R^2 entre 0,79 y 0,99). El exponente b aumentó con el pre-tratamiento en ambos aislados y sin observarse efecto del nivel de presión aplicado, indicando una mayor sensibilidad a la concentración. A bajas concentraciones (menores a 10,5% p/p) los polipéptidos presurizados presentarían menor capacidad de interactuar (lo que está de acuerdo con el aumento en la CC). Pero a altas concentraciones (10,5 y 12,0% p/p) se favorecerían interacciones entre los polipéptidos de manera más rápida (disminución del $P_{10,3}$ y las muestras pre-tratadas a 400 MPa presentaron mayor G' que las sin presurizar).

En estos casos, a diferencia de las muestras no pre-tratadas, se encontró que en la mayoría de casos el exponente b fue mayor al final del enfriamiento (20 °C) que al final del calentamiento (90 °C) (Tabla 7). Este comportamiento sugiere que durante el enfriamiento las proteínas pre-tratadas interactúan menos eficientemente que durante el calentamiento (Renkema, *et al.*, 2001).

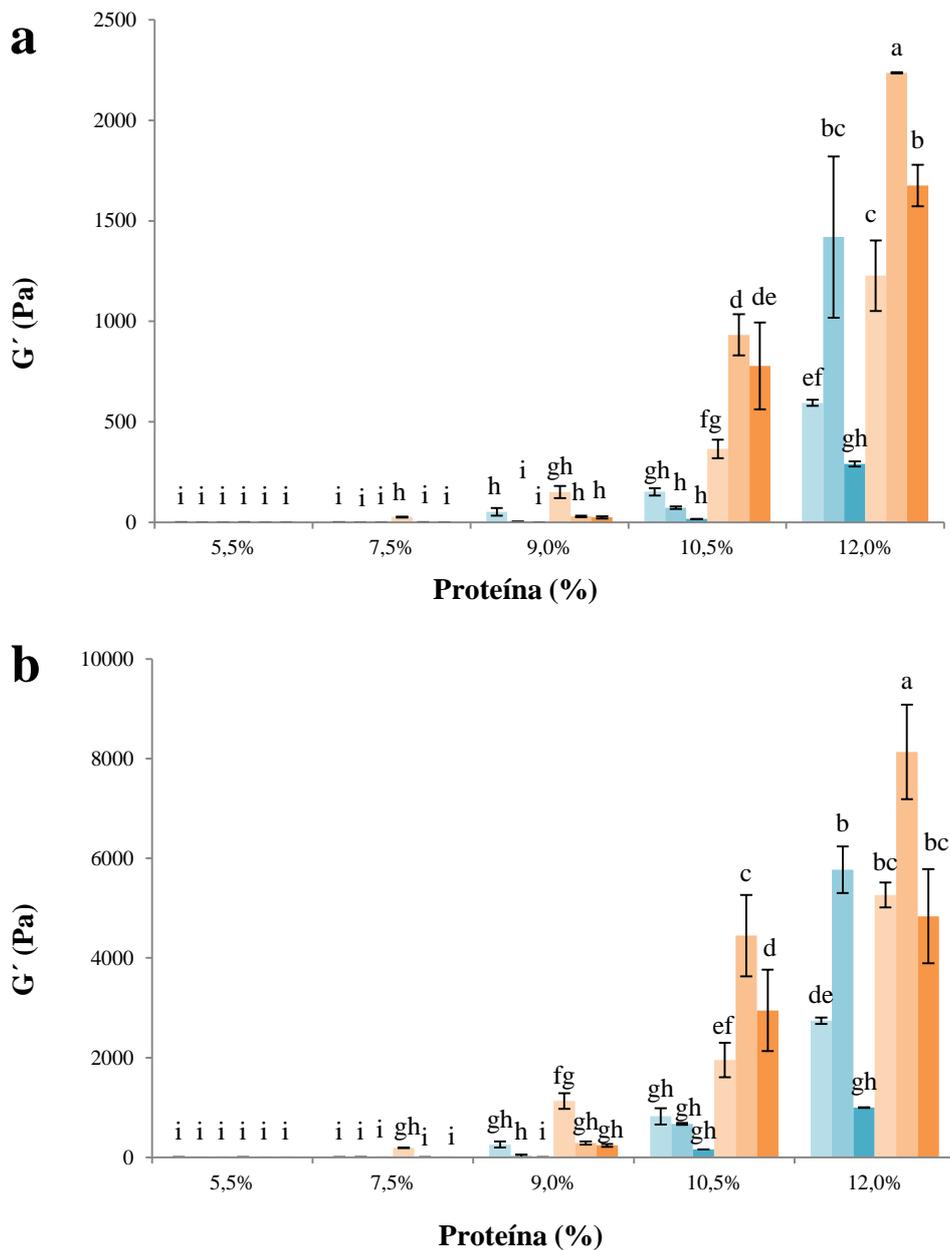


Figura 8: Módulo G' (a 1 Hz) en función de la concentración proteica de A8 (celeste) y A10 (naranja) sin pre-tratamiento o con pre-tratamiento a 400 o 600 MPa. Ciclo térmico en reómetro con velocidad de calentamiento y enfriamiento de 20 °C/min, **a**) al finalizar el *plateau* de 20 min a 90 °C, **b**) al finalizar la etapa de enfriamiento hasta 20 °C. Promedio \pm error estándar. Letras distintas en cada panel indican diferencias significativas ($p < 0,05$). A8-0,1 MPa (■), A8-400 MPa (■) y A8-600 MPa (■). A10-0,1 MPa (■), A10-400 MPa (■) y A10-600 MPa (■).

Tabla 7: Exponente b de la ley de la potencia ($G' = a C^b$) de A8 y A10 sin pre-tratamiento o con pre-tratamiento con APH.

	b (90 °C)		b (20 °C)
A8	8,57 ± 0,05f	A8	9,80 ± 0,22f
A8-400 MPa	14,86 ± 0,04de	A8-400 MPa	17,24 ± 0,01ab
A8-600 MPa	13,99 ± 0,41e	A8-600 MPa	15,84 ± 0,00bcd
A10	8,64 ± 1,09f	A10	9,05 ± 0,68f
A10-400 MPa	15,43 ± 0,26cde	A10-400 MPa	14,78 ± 0,89de
A10-600 MPa	16,85 ± 0,04abc	A10-600 MPa	18,21 ± 0,09a

Los valores de b se calcularon a partir de los valores de G' a 1 Hz, al finalizar la etapa de calentamiento (90 °C) y al finalizar la etapa de enfriamiento (20 °C). Rango de concentración (C) de 5,5 a 12,0% p/p (R^2 tuvo valores entre 0,79 y 0,99 para cada muestra). Promedio ± error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Con respecto a la viscoelasticidad de los geles obtenidos con dispersiones pre-tratadas con APH, una vez superada la CC, se observó una disminución de la $\tan \delta$. Al finalizar la etapa de *plateau* se observó disminución de $\tan \delta$, que dependió del nivel de presión, a 600 MPa se obtuvieron los menores valores de $\tan \delta$, principalmente en A10. Al finalizar el ciclo, luego de la etapa de enfriamiento el efecto no fue tan marcado, incluso a 600 MPa no se encontraron diferencias significativas (Tabla 8). Al analizar el crecimiento relativo de G' durante el enfriamiento (Q), los mayores valores se encontraron a las concentraciones menores a la CC, pero este crecimiento en G' no alcanzó para formar geles ($\tan \delta$ fueron mayor a 0,3, incluso mayor a la unidad) (Tabla 8). Al superar la CC, el Q fue cercano a 3, sin diferencias significativas ($p > 0,05$). Al comparar los valores de Q de las muestras pre-tratadas, con los de las muestras no presurizadas (Tabla 3), por ejemplo al 12,0% ($4,6 \pm 0,0$ para A8 y $4,4 \pm 0,4$ para A10) se observa que el TAPH, principalmente a 600 MPa desfavoreció las interacciones que ocurrieron durante el enfriamiento. Este comportamiento está en acuerdo con lo sugerido en la Sección 2.2.1. al analizar el efecto de la concentración proteica en las muestras pre-tratadas.

Tabla 8: Viscoelasticidad ($\tan \delta$) y Q en función de la concentración proteica de dispersiones de A8 y A10 pre-tratadas con APH.

	MPa	Proteína (% p/p)	$\tan \delta$ -90°C	$\tan \delta$ -20°C	Q
A8	400	5,5	5,50 ± 0,46a	6,43 ± 0,43a	0,9 ± 0,1f
		7,5	1,29 ± 0,25a	1,06 ± 0,23a	12,6 ± 6,3bc
		9,0	0,67 ± 0,18b	0,68 ± 0,35b	13,2 ± 2,3ab
		10,5	0,30 ± 0,00cd*	0,17 ± 0,01d*	9,3 ± 0,6bcd
		12,0	0,12 ± 0,20d	0,15 ± 0,00ef	4,3 ± 0,9ef
	600	5,5	4,44 ± 0,42a	4,00 ± 0,11a	1,0 ± 0,0f
		7,5	3,75 ± 0,20a	0,95 ± 0,02a	10,0 ± 0,1bc
		9,0	1,65 ± 0,11a	0,70 ± 0,00b	17,3 ± 0,2a
		10,5	0,31 ± 0,01c*	0,19 ± 0,00c*	9,6 ± 0,2bc
		12,0	0,11 ± 0,00d	0,15 ± 0,00f	3,4 ± 0,1ef
A10	400	5,5	6,71 ± 3,12a	1,76 ± 0,37a	7,9 ± 0,3cde
		7,5	0,63 ± 0,06b	0,58 ± 0,12d	7,5 ± 3,5ef
		9,0	0,27 ± 0,01c*	0,19 ± 0,01c*	9,9 ± 0,5bc
		10,5	0,10 ± 0,00d	0,17 ± 0,01d	4,7 ± 0,4def
		12,0	0,10 ± 0,02d	0,17 ± 0,00d	3,6 ± 0,4ef
	600	5,5	3,95 ± 0,43a	4,50 ± 0,42a	1,1 ± 0,1f
		7,5	1,45 ± 1,04a	2,01 ± 1,10a	3,9 ± 0,1ef
		9,0	0,29 ± 0,04c*	0,20 ± 0,00c*	10,2 ± 1,5bc
		10,5	0,08 ± 0,00d	0,16 ± 0,00df	3,8 ± 0,0ef
		12,0	0,08 ± 0,00d	0,18 ± 0,00d	2,9 ± 0,3f

Ciclo térmico en reómetro con velocidad de calentamiento y enfriamiento de 20 °C/min, con *plateau* de 20 min a 90 °C y etapa de enfriamiento hasta 20 °C. Promedio ± error estándar. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). (*: CC).

2.2.2. Efecto de la temperatura de *plateau*

El comportamiento del módulo elástico con el aumento de la temperatura no siguió un patrón definido en todo el rango de temperatura. Al final del *plateau*, en las dispersiones al 10,5% p/p, los pre-tratamientos con APH (400 o 600 MPa) produjeron aumentos en los valores de G' de ambos aislados en los ciclos con temperaturas máximas desde 50 hasta 80 °C, observando los mayores valores a 600 MPa (Figura 9a). Este comportamiento sugiere que las proteínas pudieron interactuar entre sí a través de interacciones hidrofóbicas gracias a que se encontraban parcial (400 MPa) o totalmente (600 MPa) desnaturalizadas y exponiendo sitios reactivos. En los ciclos con temperaturas mayores (90 y 95 °C), el efecto del pre tratamiento no fue significativo ($p > 0,05$). De esta manera, a temperaturas mucho menores a las T_d de A8 y A10, las matrices de estas dispersiones comenzaron a estructurarse. Los valores de $\tan \delta$ al final del *plateau* en las muestras pre-tratadas fueron menores a 0,3 a partir de 60 °C a 400 MPa y a partir de 50 °C a 600 MPa en ambos aislados (Tabla 9), indicando un mayor grado de elasticidad que en las muestras no pre-tratadas (en que la $\tan \delta$ era menor a 0,3 a partir de 70 °C (A10) u 80 °C (A8)). Estos comportamientos sugieren que la desnaturalización previa permitió ordenarse durante el calentamiento y establecer interacciones más específicas que cuando la agregación fuera al azar, muy rápida, simultánea o incluso anterior a la desnaturalización (Sun y Arntfield, 2010). Al final del ciclo térmico (20 °C), los pre-tratamientos con APH (400 o 600 MPa) produjeron aumentos en los valores de G' de ambos A8 y A10 en los ciclos con temperaturas máximas de 50, 60 y 70 °C con respecto a las muestras no pre-tratadas. A 80 °C solo el pre-tratamiento con 600 MPa aumentó significativamente la elasticidad en ambos aislados. En cambio, a partir de 90 °C, el efecto del pre-tratamiento con APH fue diferente para cada aislado. En A8 el pre-tratamiento con 400 MPa disminuyó la elasticidad y con 600 no hubo cambios significativos. En A10 G' aumentó significativamente con 400 MPa y con 600 MPa aumentó en menor medida a 90 °C y se observó disminución a 95 °C (Figura 9b).

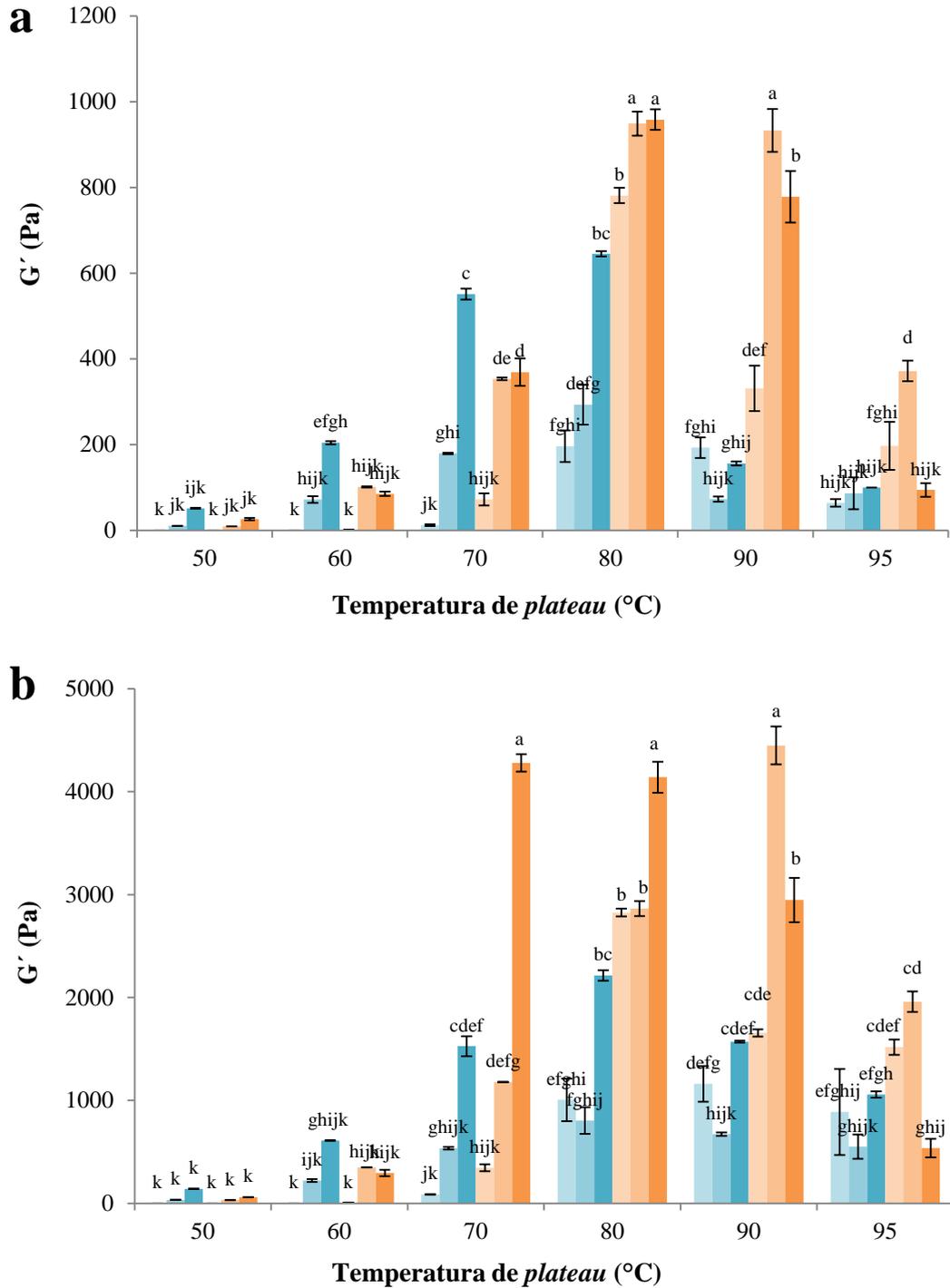


Figura 9: Módulo G' (a 1 Hz) en función de la temperatura de *plateau*, de dispersiones proteicas al 10,5% p/p de A8 (celeste) y A10 (naranja) sin pre-tratamiento o con pre-tratamiento a 400 o 600 MPa. Ciclo térmico en reómetro con velocidad de calentamiento y enfriamiento de 20 °C/min, a) al finalizar el *plateau* de 20 min a temperatura variable, b) al finalizar la etapa de enfriamiento hasta 20 °C. Promedio \pm error estándar. Letras distintas en un mismo panel indican diferencias significativas ($p < 0,05$). A8-0,1 MPa (■), A8-400 MPa (■) y A8-600 MPa (■). A10-0,1 MPa (■), A10-400 MPa (■) y A10-600 MPa (■).

Al final del ciclo térmico también se encontró un descenso en las temperaturas a las cuales la $\tan \delta$ fue menor a 0,3: a 400 MPa desde 60 °C y a 600 MPa desde 50 °C, sin diferencias entre A8 y A10. Al finalizar los ciclos con temperaturas hasta 80 °C, las $\tan \delta$ fueron mayores que al finalizar el *plateau*. En cambio a 90 y 95 °C, el enfriamiento disminuyó los valores de $\tan \delta$. Con respecto al crecimiento relativo de G' durante el enfriamiento (Q) los mayores valores se encontraron en estos ciclos de mayor temperatura, alrededor de 10 veces para A8 y 5 veces para A10. En los ciclos de temperaturas más bajas (de 50 a 80 °C), Q tomó valores *ca.* 3 sin observarse diferencias significativas entre ambos aislados y presiones (Tabla 9).

En conjunto estas observaciones indican que las modificaciones estructurales que los pre-tratamientos con APH (a 400 o 600 MPa) generaron en ambos A8 y A10 llevaron a aumentar la fuerza (mayores valores de G') y el carácter elástico (menores valores de $\tan \delta$) en geles obtenidos a temperaturas entre 60 y 80 °C. Sin embargo, en geles obtenidos a 90 o 95 °C el efecto de APH dependió del valor de presión y fue diferente para cada aislado, en A10 los mayores valores de G' se obtuvieron con el tratamiento a 400 MPa, mientras que en A8 el aumento fue de menor magnitud y se observó a 600 MPa. A las mayores temperaturas otros factores, como el aumento de la energía cinética, estarían implicados interactuando con las variables tipo de aislado, nivel de presión y temperatura de *plateau*, por lo que no se pudo establecer un patrón en el comportamiento. Los aumentos en G' se lograrían principalmente por un favorecimiento de las interacciones que se dieron durante el calentamiento (del tipo hidrofóbicas). Estos comportamientos podrían emplearse en estrategias de gelificación a temperaturas relativamente bajas. A su vez, la viscoelasticidad fue adecuada (bajos valores de $\tan \delta$) al finalizar el *plateau* en los ciclos entre 50 y 80 °C, lo que podría usarse para aumentar la textura de alimentos que se consumen en caliente.

Tabla 9: Viscoelasticidad ($\tan \delta$) y Q en función de la temperatura de *plateau* de A8 y A10 pre-tratados con APH.

	MPa	Temperatura de <i>plateau</i> (°C)	$\tan \delta$ —al final del <i>plateau</i>	$\tan \delta$ -20°C	Q
A8	400	50	0,32 ± 0,03b	0,31 ± 0,00b	3,2 ± 0,0fgh
		60	0,15 ± 0,01ghi*	0,16 ± 0,00hijk*	3,1 ± 0,1fgh
		70	0,09 ± 0,00jk	0,14 ± 0,00jk	3,0 ± 0,0fgh
		80	0,09 ± 0,00k	0,14 ± 0,00jk	2,7 ± 0,0gh
		90	0,30 ± 0,00bc	0,17 ± 0,01fghi	9,3 ± 0,6b
		95	0,21 ± 0,03ef	0,17 ± 0,01fghi	7,1 ± 1,7c
	600	50	0,27 ± 0,01cd*	0,24 ± 0,00c*	2,7 ± 0,1gh
		60	0,13 ± 0,00i	0,15 ± 0,00ijk	3,0 ± 0,1fgh
		70	0,09 ± 0,00k	0,18 ± 0,01defg	2,8 ± 0,2gh
		80	0,08 ± 0,00k	0,20 ± 0,00de	3,4 ± 0,1fgh
		90	0,16 ± 0,01ghi	0,18 ± 0,03efgh	10,1 ± 0,3ab
		95	0,22 ± 0,01e	0,17 ± 0,00fghi	10,6 ± 0,3ab
A10	400	50	0,59 ± 0,04a	0,47 ± 0,00a	3,5 ± 0,1fgh
		60	0,17 ± 0,00fgh*	0,18 ± 0,00efgh*	3,5 ± 0,1fgh
		70	0,10 ± 0,00jk	0,14 ± 0,00k	3,3 ± 0,0fgh
		80	0,09 ± 0,01k	0,16 ± 0,01ghij	3,0 ± 0,1fgh
		90	0,10 ± 0,00jk	0,17 ± 0,01ghi	4,7 ± 0,4def
		95	0,16 ± 0,00ghi	0,18 ± 0,01efgh	5,6 ± 1,1cde
	600	50	0,24 ± 0,00de*	0,20 ± 0,00d*	2,3 ± 0,1h
		60	0,13 ± 0,00ij	0,15 ± 0,01ijk	3,5 ± 0,2fgh
		70	0,18 ± 0,00fg	0,19 ± 0,00def	3,8 ± 0,3fgh
		80	0,15 ± 0,00hi	0,16 ± 0,00ghij	4,3 ± 0,2defg
		90	0,08 ± 0,00k	0,16 ± 0,00ghij	3,8 ± 0,0efgh
		95	0,14 ± 0,01i	0,17 ± 0,00fghi	5,7 ± 0,0cd

Dispersiones proteicas al 10,5% p/p. Ciclo térmico en reómetro con velocidad de calentamiento y enfriamiento de 20 °C/min, con *plateau* de 20 min a temperatura variable y etapa de enfriamiento hasta 20 °C. Promedio ± error estándar. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). (*: TC).

3. Efecto de la incorporación de calcio en el proceso térmico de gelificación de APC

La incorporación de calcio, además de aumentar el valor nutritivo, permite obtener geles con menor concentración proteica. El calcio induce modificaciones en el comportamiento térmico de las dispersiones proteicas, en la capacidad de interactuar entre las proteínas y por lo tanto en las propiedades reológicas de los geles obtenidos. Se estudiaron las condiciones críticas de gelificación y el comportamiento reológico de dispersiones proteicas de APC incorporando CaCl_2 antes del ciclo térmico aplicado para gelificar. Se evaluó el efecto de la concentración proteica (en un rango de 5,5 a 10,5% p/p), manteniendo constante la relación proteína/calcio incorporado. Luego se fijó una concentración (7,5% p/p y 15 mM de CaCl_2) y se evaluó el efecto de la temperatura máxima de *plateau* en ciclos térmicos en reómetro con velocidades de calentamiento y enfriamiento de 20 °C/min. Para comparar con las propiedades térmicas se aplicó un ciclo térmico con *plateau* a 90 °C en el reómetro a una dispersión al 7,5% p/p y 15 mM de calcio a una velocidad de calentamiento y enfriamiento de 1 °C/min igual a la utilizada en el DSC.

3.1. Condiciones críticas de gelificación

3.1.1. Concentración Crítica

La CC de gelificación evaluada en ciclos térmicos calentando hasta 90 °C y con velocidades de calentamiento y enfriamiento de 20 °C/min disminuyó con la presencia de calcio en una relación proteína/calcio de 0,5% p/p de proteína/mM de CaCl_2 . La disminución se verificó tanto en A8 como en A10, la CC de gelificación fue de 7,5 y 5,5% p/p respectivamente (ver más adelante valores de $\tan \delta$ en la Tabla 12, Sección 3.2.1. sobre el comportamiento reológico), es decir en un nivel inferior de concentración, comparando con las muestras sin calcio adicionado. Esta disminución de la CC se debió probablemente a la capacidad del ion calcio para establecer puentes iónicos entre los restos de aminoácidos cargados negativamente de las proteínas de caupí. Los puentes iónicos se sumarían a las otras interacciones, permitiendo que la matriz tuviera una estructura tridimensional con características de gel a menor concentración proteica. Por otra parte, la presencia de calcio produjo una disminución del pH hasta $6,4 \pm 0,2$. Este descenso se debe a que el ion calcio compite por sitios de unión con protones, los que son liberados al medio

(Kroll, 1984). Esta disminución del pH probablemente contribuyó a disminuir la carga superficial de las proteínas, disminuyendo la repulsión electrostática y facilitando también la asociación entre polipéptidos.

3.1.2. Temperatura crítica o tiempo crítico de gelificación.

La TC de gelificación se evaluó en dispersiones proteicas al 7,5% p/p y CaCl_2 15 mM realizando ciclos térmicos con temperatura de *plateau* variable. La TC, definida como aquella en que la $\tan \delta$ fuera menor a 0,3, al finalizar el *plateau* y el ciclo térmico, fue 80 °C para ambos aislados (ver más adelante valores de $\tan \delta$ en la Tabla 14, Sección 3.2.2. sobre el comportamiento reológico). Sin embargo, a cualquier temperatura máxima ensayada se encontró que al final del *plateau* los valores de G' fueron iguales o superiores a los de G'' . Para 50, 60 y 70 °C el P_{EC} , definido como el punto en que G' igualó a G'' , ocurrió durante el *plateau*, mientras que para el resto de los ciclos con temperaturas máximas mayores, el P_{EC} se verificó durante el calentamiento, a ca. 70 °C (Tabla 10). Notablemente, la presencia de calcio canceló ciertas diferencias entre A8 y A10 ya que el efecto del aumento de la temperatura de *plateau* fue el mismo en ambos aislados, cabe señalar que sin calcio adicionado, A8 no lograba gelificar al 7,5% p/p y A10 sí lo hacía. Considerando que a 50, 60 o 70 °C no se superó la Td de las proteínas, estos datos sugieren que la presencia de calcio favoreció el establecimiento de interacciones que no necesitaron alto grado de desnaturalización proteica, pero que no llegaron a formar una matriz suficiente como para llegar al $P_{t0,3}$. Cuando se realizaron ciclos con temperaturas de *plateau* mayores o iguales a 80 °C, pudieron favorecerse otras interacciones que permitieron llegar a una matriz viscoelástica con $\tan \delta$ menor a 0,3. Estas interacciones podrían ser del tipo hidrofóbicas dado que ocurrieron con el aumento de la temperatura, favorecidas principalmente hasta los 90 °C, a los 95 °C los cambios no fueron significativos ($p > 0,05$; Tabla 10). Si bien Scilingo y Añón (2004) reportaron disminución de la hidrofobicidad superficial de aislado proteico de soja por la presencia de calcio, como también un efecto de enmascaramiento de grupos sulfhidrilos libres, en la gelificación de las proteínas de caupí en presencia de calcio, las interacciones hidrofóbicas presentarían un rol importante. Sin embargo, el efecto reportado por estas autoras podría ser el responsable de disminuir las diferencias en hidrofobicidad de los aislados A8 y A10, y en sus capacidades de gelificación.

Tabla 10: P_{EC} y $P_{10,3}$ de A8 y A10 con $CaCl_2$ a diferentes temperaturas de *plateau*.

	Temperatura de <i>plateau</i> (°C)	P_{EC}	$P_{10,3}$ (min)
A8-Ca	50	2,28 ± 0,12a (min)	∞
	60	0,37 ± 0,03b (min)	∞
	70	0,00 ± 0,00c (min)	∞
	80	72,25 ± 2,25A (°C)	2,94 ± 0,41a
	90	70,80 ± 0,20A (°C)	0,65 ± 0,10b
	95	70,30 ± 0,30A (°C)	0,50 ± 0,15b
A10-Ca	50	2,30 ± 0,26a (min)	∞
	60	0,32 ± 0,02b (min)	∞
	70	0,00 ± 0,00c (min)	∞
	80	70,40 ± 0,40A (°C)	0,17 ± 0,17b
	90	70,55 ± 0,25A (°C)	0,26 ± 0,01b
	95	70,60 ± 0,10A (°C)	0,47 ± 0,12b

Dispersiones proteicas al 7,5% p/p y 15 mM de $CaCl_2$. Ciclos térmicos en reómetro con velocidad de calentamiento y enfriamiento de 20 °C/min, con *plateau* de 20 min a temperatura variable. Promedio ± error estándar. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Letras mayúsculas fueron utilizadas para temperaturas y letras minúsculas para tiempos. (∞: no se alcanzó el $P_{10,3}$ a ningún tiempo del ensayo).

Estos datos sugieren entonces que la presencia de calcio favoreció el establecimiento de interacciones que no necesitan alto grado de desnaturalización (podrían ser las de tipo puente de calcio), pero para alcanzar una matriz viscoelástica suficiente para formar un buen gel se requirió la desnaturalización proteica para establecer más interacciones durante el calentamiento (del tipo hidrofóbicas).

3.1.3. Relación con propiedades térmicas

Los termogramas obtenidos a partir de dispersiones proteicas al 7,5% p/p y 15 mM CaCl₂ mostraron un corrimiento de la endoterma hacia mayores temperaturas que las muestras sin calcio, las Td aumentaron 4,6 y 3,8 °C para A8 y A10 respectivamente (Tabla 11). Estos aumentos indican que la presencia de calcio estabilizó térmicamente a las proteínas de caupí. Scilingo y Añón (2004) y Speroni *et al.* (2010a), quienes trabajaron con proteínas de reserva de soja enriquecidas en calcio, encontraron que la presencia de calcio podía estabilizar o desestabilizar térmicamente las proteínas dependiendo de la concentración de calcio adicionado y del tipo y proporción de proteína presente en los aislados proteicos de soja. Estos autores explicaron que la estabilización térmica era posible por la presencia de complejos proteína-calcio con mayores Td, y la desestabilización por la disminución de interacciones hidrofóbicas que mantienen la estructura proteica (razón por la cual se lo ubica al ion calcio al final de la serie de Hoffmeister como desestabilizante de la estructura proteica). El aumento de la Td de las proteínas de las APC en presencia de calcio, concuerda con el aumento en la TC de gelificación hasta 80 °C que se encontró en la Sección anterior.

Tabla 11: Propiedades térmicas y P_{EC} de A8 y A10 sin y con CaCl₂.

	ΔH (J/g)	Td (°C)	Tonset (°C)	Toffset (°C)	P _{EC} (°C) Ciclo a 90 °C
A8					
0 mM	6,58 ± 0,06a	76,74 ± 0,36b	70,00 ± 1,26b	81,60 ± 0,26b	49,50 ± 2,39*
15 mM	6,60 ± 0,05a	81,38 ± 0,09a	73,66 ± 0,15a	86,74 ± 0,14a	57,25 ± 2,35b
A10					
0 mM	5,59 ± 0,07c	77,85 ± 0,15b	70,04 ± 0,21b	82,12 ± 0,20b	77,55 ± 2,05 ^a
15 mM	6,00 ± 0,08b	81,70 ± 0,02a	74,47 ± 0,35a	87,10 ± 0,04a	44,50 ± 3,36c

Dispersiones proteicas al 7,5% p/p de A8 y A10 sin (0 mM) y con CaCl₂ (15 mM). Calorimetría y ciclos térmicos en reómetro (con *plateau* de 20 min a 90 °C) a 1 °C/min. Promedio ± error estándar. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas (p<0,05). (*: temperatura durante la etapa de enfriamiento).

La presencia de calcio aumentó la entalpía de desnaturalización (ΔH) en A10 pero no en A8 en las condiciones ensayadas (Tabla 11). El calcio favorecería interacciones cuyas rupturas fueron endotérmicas, como interacciones dependientes de calcio o puentes de hidrógenos, que se habrían podido establecer entre los polipéptidos de A10, pero no entre los de A8.

En los ensayos de gelificación realizados calentando a 1 °C/min (velocidad empleada también en los ensayos de DSC) se observó que el P_{EC} y un gran aumento en la tasa de crecimiento de los módulos se produjeron a temperaturas menores a 60 °C (Tabla 11 y Figura 10b). Estos resultados refuerzan la idea de que en presencia de calcio las proteínas de caupí comenzaron la gelificación con un grado muy bajo de desnaturalización, concordando con los datos obtenidos en los ensayos de gelificación realizados calentando a 20 °C/min de la Sección anterior.

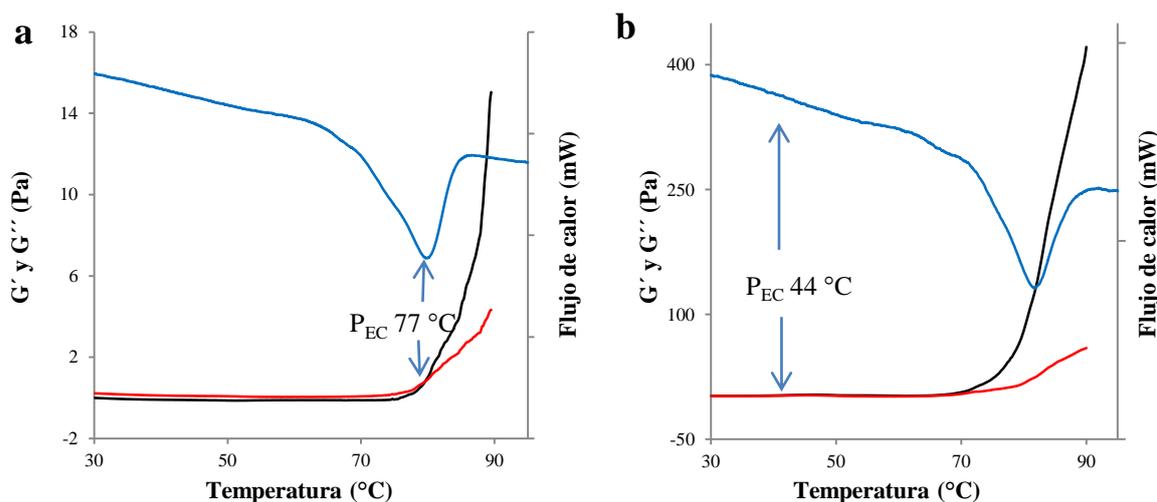


Figura 10: Proceso de desnaturalización térmica y proceso térmico de gelificación de dispersiones de A10 al 7,5% p/p **a)** sin calcio y **b)** con 15 mM de calcio. Velocidad de calentamiento a 1 °C/min en ambos procesos. Flujo de calor (—), G' (—) y G'' (—).

La Figura 10 muestra el proceso de desnaturalización térmica (obtenido por DSC) superpuesto al proceso de gelificación térmica (obtenido por reología) en función de la temperatura (ambas determinaciones a 1 °C/min). Durante el calentamiento en ausencia de calcio (Figura 10a) el P_{EC} coincide con la T_d (en A10) y el crecimiento abrupto de los módulos G' y G'' se produce al finalizar el proceso de desnaturalización proteica. En cambio, con la presencia de calcio (Figura 10b) el P_{EC} ocurre a bajas temperaturas (ca. a 50 °C para ambos aislados) y el crecimiento de los módulos ocurre de manera gradual y antes del comienzo del proceso de desnaturalización. Las interacciones dependientes de calcio

serían las responsables del aumento de los módulos en la primer etapa con bajo grado de desnaturalización y las interacciones hidrofóbicas las de la segunda etapa, donde las temperaturas son mayores, y las proteínas se desnaturalizan exponiendo mayor cantidad de sitios hidrofóbicos.

Al igual que en las muestras sin calcio, la disminución de la velocidad de calentamiento provocó que el inicio de la gelificación ocurriera antes (P_{EC} a 20 °C/min fue *ca.* 70 °C (Tabla 10) y a 1 °C/min *ca.* 50 °C (Tabla 11), en promedio para ambos aislados.

3.2 Comportamiento reológico

Al analizar las curvas de los módulos G' y G'' en función del tiempo se observó que la presencia de calcio aumentó los valores iniciales de ambos módulos en las dispersiones proteicas de A8 y A10 ($p < 0,05$, Figura 11). Si bien estos valores iniciales fueron menores a 1 Pa y la componente viscosa fue mayor a la elástica, este aumento reflejó las asociaciones entre polipéptidos inducidas por el ion calcio, ocurridas en las dispersiones sin tratamiento térmico. Al aumentar la temperatura G' y G'' sufrieron una disminución hasta 52,05 ± 0,36 °C (mínimo de módulos sin diferencias significativas con las dispersiones sin calcio ($p > 0,05$); Figura 11a). La desestructuración de la matriz viscoelástica por el aumento de la temperatura sugiere que las interacciones que mantenían dicha matriz eran puentes de hidrogeno o de calcio, interacciones bajo control entálpico (Myers, 1990). A partir de los 52,05 °C G'' aumentó hasta un máximo parcial detectado a 65,86 ± 1,48 °C (temperatura 12 °C menor que el observado en ausencia de calcio). Por su parte G' aumentó más lentamente y el máximo parcial fue a 74,72 ± 0,04 °C, por lo que los máximos parciales de G' y G'' dejaron de ser simultáneos como en las muestras sin calcio, lo que podría deberse a las nuevas interacciones dependiente de calcio (Figura 11a). Durante el *plateau* los módulos crecieron (cuando las temperaturas fueron mayores a 70 °C) y cuando comenzó el enfriamiento el crecimiento fue más rápido que durante el *plateau* al igual que las muestras sin calcio (Figura 11b).

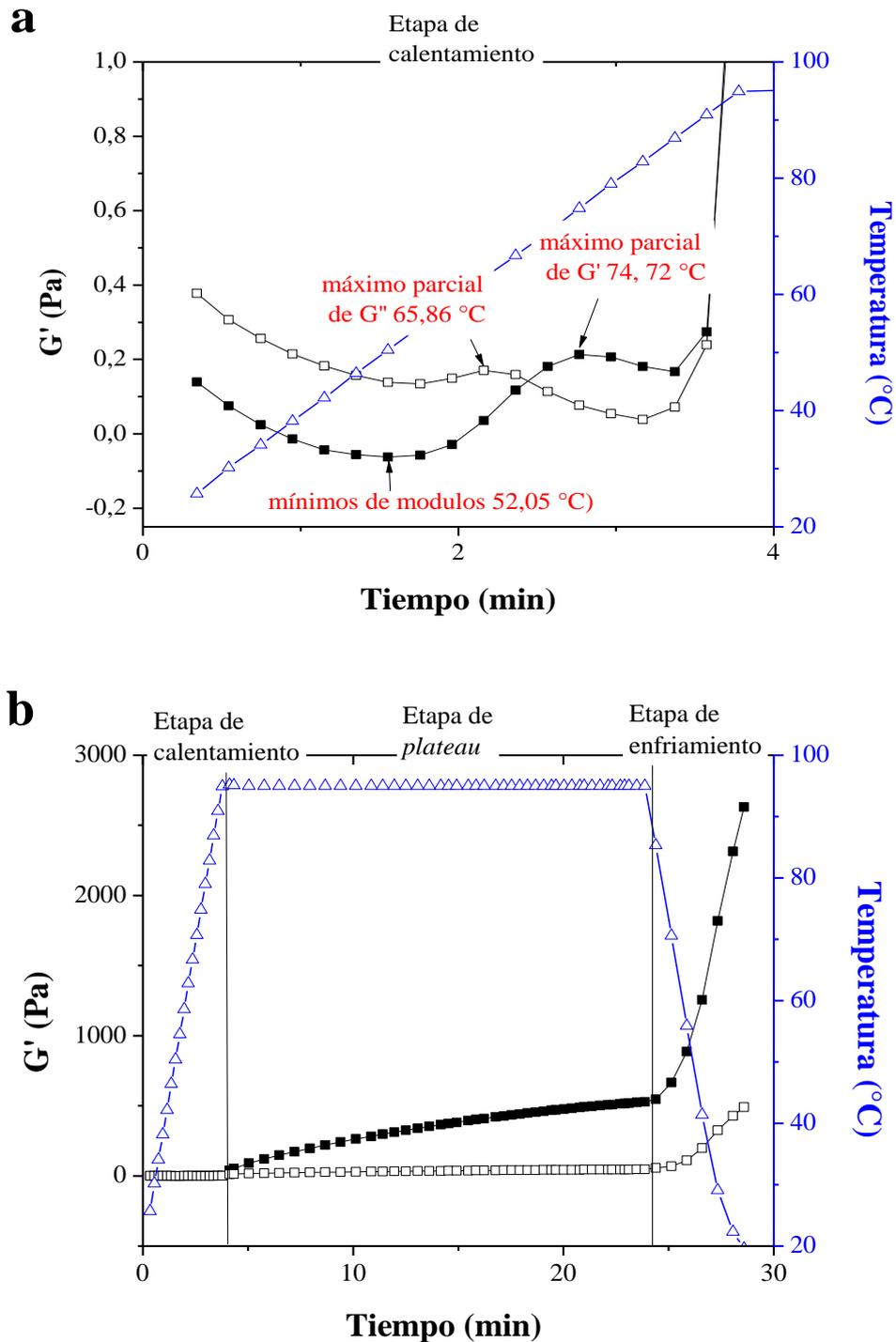


Figura 11: Módulos G' (■) y G'' (□) y temperatura (Δ) en función del tiempo de dispersión proteica al 7,5% p/p de A10 con 15 mM de CaCl_2 . **a**) Etapa de calentamiento: Temperaturas de mínimos y máximo parciales de G' y G'' . **b**) Ciclo térmico completo: etapa de calentamiento de 20 a 95°C a $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$; etapa de *plateau* de 20 min a 95°C , y etapa de enfriamiento de 95 a 20°C a $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

3.2.1. Efecto de la concentración proteica

Los valores de G' a cada concentración proteica aumentaron con la incorporación de calcio, tanto al final del *plateau* como al final del ciclo, comparando con las muestras sin calcio adicionado. Al igual que en las muestras sin calcio, el aumento de la concentración proteica en los geles con calcio incorporado aumentó el valor de G' (Figura 12) y una vez alcanzada la CC los valores de $\tan \delta$ de los geles obtenidos no fueron función de la concentración proteica (Tabla 12) tanto cuando se evaluaron estos parámetros al finalizar el *plateau* a 90 °C como al finalizar la etapa de enfriamiento. Con respecto a los dos APC, al finalizar el *plateau* a 90 °C, a 7,5 % p/p, los módulos de los geles de A8 fueron menores que los de A10, sin embargo a mayor concentración y al evaluar G' al finalizar la etapa de enfriamiento la presencia de calcio canceló las diferencias entre los módulos de los geles formados por ambos aislados (Figura 12a y b), las $\tan \delta$ no presentaron diferencias significativas en ninguna de las condiciones entre ambos aislados ($p > 0,05$; Tabla 12). Es probable que la cantidad de sitios con carga negativa, que servirían al ion calcio para establecer puentes, fuera equivalente en ambos aislados, ya que la composición polipeptídica fue indistinguible (Sección 2.1. del Capítulo I). A altas concentraciones proteicas y de calcio, el componente dado por las interacciones electrostáticas dependientes de calcio probablemente enmascaró la mayor habilidad de A10 para establecer interacciones hidrofóbicas.

La presencia de calcio indujo una disminución en la $\tan \delta$ al final del *plateau* con respecto a las dispersiones sin calcio adicionado (*ca.* 0,17 para muestras sin calcio y *ca.* 0,09 para las muestras con calcio; $p < 0,05$). Pero al evaluar la $\tan \delta$ al finalizar la etapa de enfriamiento, no hubo diferencias significativas entre las muestras con o sin calcio (valores *ca.* 0,20) (Tabla 12). Esto sugiere que el calcio promovió el establecimiento de interacciones favorecidas por el calentamiento que aumentaron el componente elástico, como se postuló también cuando se analizó el comienzo de la gelificación en la Sección 3.1.2.

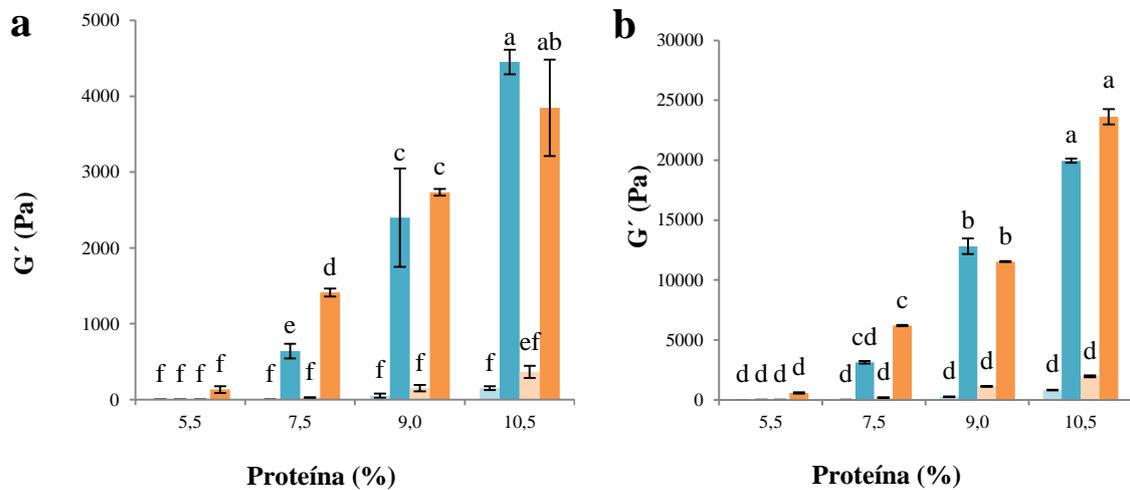


Figura 12: Módulo G' (a 1 Hz) en función de la concentración proteica de A8 (celeste) y A10 (naranja) sin y con calcio (en una relación de 0,5 % p/p de proteína/mM de CaCl_2). Ciclo térmico en reómetro con velocidad de calentamiento y enfriamiento de $20\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, **a)** al finalizar el *plateau* de 20 min a $90\text{ }^\circ\text{C}$, **b)** al finalizar la etapa de enfriamiento hasta $20\text{ }^\circ\text{C}$. Promedio \pm error estándar. Letras distintas en cada panel indican diferencias significativas ($p < 0,05$). A8-sin calcio (■) y A8-con calcio (■). A10-sin calcio (■) y A10-con calcio (■).

El crecimiento relativo de G' durante la etapa de enfriamiento (Q) fue *ca.* 5 y no fue función de la concentración proteica una vez superada la CC ($p > 0,05$; Tabla 12). No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) con las muestras sin calcio a las mayores concentraciones que se discutieron en la Sección 1.2.1. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los valores de Q de cada aislado ($p > 0,05$; Tabla 12). Estos resultados indican que en la gelificación térmica con incorporación de calcio las interacciones principales que se dan para formar geles más elásticos y con menor $\tan \delta$ ocurrirían en la etapa de calentamiento y durante el enfriamiento se reforzarían dichas interacciones.

Tabla 12: Viscoelasticidad ($\tan \delta$) y Q en función de la concentración proteica de A8 y A10 con CaCl_2 .

Concentración (% p/p)		$\tan \delta$ -90°C	$\tan \delta$ -20°C	Q
A8-Ca	5,5	$0,48 \pm 0,01a$	$0,35 \pm 0,10a$	$12,8 \pm 1,0a$
	7,5	$0,09 \pm 0,00b^*$	$0,19 \pm 0,00b^*$	$4,9 \pm 0,1b$
	9	$0,09 \pm 0,00b$	$0,20 \pm 0,00b$	$5,3 \pm 0,2b$
	10,5	$0,09 \pm 0,00b$	$0,20 \pm 0,00b$	$4,5 \pm 0,2b$
A10-Ca	5,5	$0,08 \pm 0,00b^*$	$0,17 \pm 0,00b^*$	$4,4 \pm 0,1b$
	7,5	$0,08 \pm 0,00b$	$0,20 \pm 0,00b$	$4,4 \pm 0,2b$
	9	$0,09 \pm 0,00b$	$0,20 \pm 0,00b$	$4,2 \pm 0,5b$
	10,5	$0,09 \pm 0,00b$	$0,20 \pm 0,00b$	$7,0 \pm 2,5b$

Relación proteína/calcio de 0,5% p/p de proteína/mM de CaCl_2 . Ciclo térmico en reómetro con velocidad de calentamiento y enfriamiento de 20 °C/min, con *plateau* de 20 min a 90 °C y etapa de enfriamiento hasta 20 °C. Promedio \pm error estándar. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). (*: CC).

Los valores de G' de los geles con calcio en función de la concentración proteica se ajustaron a la ley de la potencia, pero en este caso el ajuste fue mejor ($R^2 > 0,94$) cuando el rango de concentración proteica fue de 7,5 a 10,5% p/p, a diferencia de las muestras sin calcio que se ajustaron en todo el rango estudiado (5,5 a 12,0% p/p). La incorporación de calcio disminuyó el valor del exponente b en ambos aislados y no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) al comparar el valor de b obtenido del ajuste al finalizar el *plateau* a 90 °C o al finalizar la etapa de enfriamiento (Tabla 13). El menor valor de b indicaría menor dependencia de G' con la concentración proteica, lo que concuerda con que las proteínas tendrían más capacidad para interactuar entre ellas por la presencia de calcio, dando una matriz diferente a la de las muestras sin calcio.

Tabla 13: Exponente b de la ley de la potencia ($G' = a C^b$) de A8 y A10 sin y con CaCl_2 .

	b (90 °C)		b (20 °C)
A8	$8,57 \pm 0,05a$	A8	$9,80 \pm 0,22a$
A8-Ca	$5,83 \pm 0,44b$	A8-Ca	$5,58 \pm 0,64b$
A10	$8,64 \pm 1,09a$	A10	$9,05 \pm 0,68a$
A10-Ca	$2,74 \pm 0,45c$	A10-Ca	$3,88 \pm 0,49c$

Los valores de b se calcularon a partir de los valores de G' a 1 Hz, al finalizar la etapa de calentamiento (90 °C) y al finalizar la etapa de enfriamiento (20 °C). Rango de concentración (C) de 5,5 a 12,0% p/p para las muestras sin calcio y de 7,5 a 10,5% p/p para las muestras con calcio ($R^2 > 0,94$). Promedio \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.2.2. Efecto de la temperatura de *plateau*

En los ensayos de gelificación con temperatura de *plateau* variable se observó que en los ciclos con temperaturas hasta 70 °C, se formaron matrices con cierto nivel de estructura (se llegó al P_{EC} como se discutió en la Sección 3.1.2.) pero con valores relativamente bajos de los módulos y $\tan \delta$ mayores a 0,3. A partir de 80 °C los valores de los módulos G' al finalizar el *plateau* aumentaron considerablemente. Los mayores valores de G' se encontraron a 90 °C (Figura 13a).

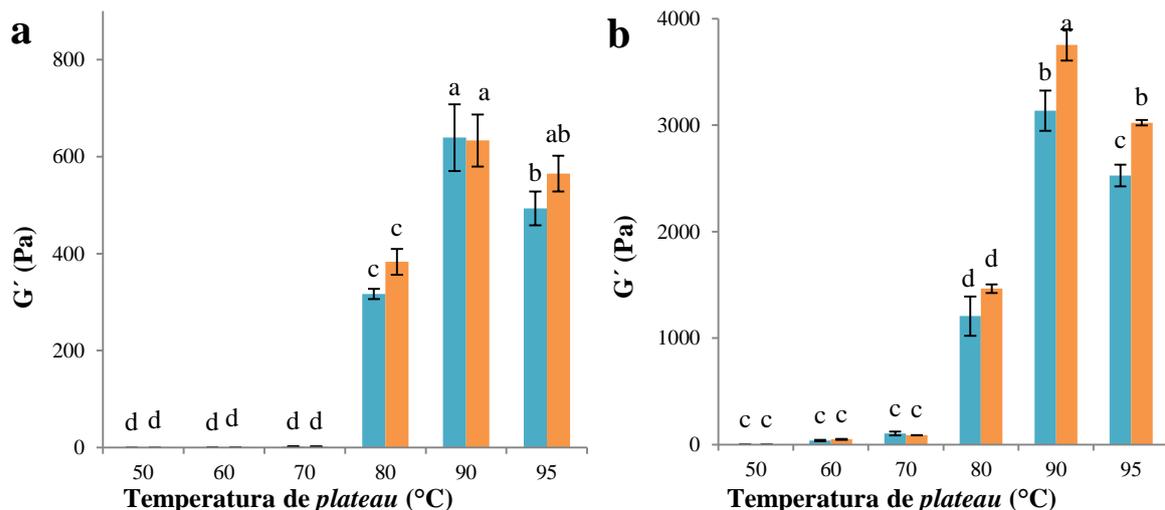


Figura 13: Módulo G' (a 1 Hz) en función de la temperatura de *plateau* de dispersiones proteicas al 7,5% p/p con 15 mM de CaCl_2 de A8 (■) y A10 (■). Ciclos térmicos en reómetro con velocidad de calentamiento y enfriamiento de 20 °C/min, **a)** al finalizar el *plateau* de 20 min a temperatura variable, **b)** al finalizar la etapa de enfriamiento hasta 20 °C. Promedio \pm error estándar. Letras distintas en un mismo panel indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 14: Viscoelasticidad ($\tan \delta$) y Q en función de la temperatura de *plateau* de A8 y A10 con CaCl₂.

	Temperatura de <i>plateau</i> (°C)	$\tan \delta$ -al final del <i>plateau</i>	$\tan \delta$ -20 °C	Q
A8-Ca	50	0,36 ± 0,16 b	0,86 ± 0,03 a	12,9 ± 3,6 c
	60	0,38 ± 0,06 b	0,53 ± 0,02 b	74,1 ± 19,7 ab
	70	0,78 ± 0,05 a	0,44 ± 0,01 c	51,7 ± 1,0 b
	80	0,11 ± 0,01 c*	0,18 ± 0,01 d*	3,8 ± 0,5 d
	90	0,09 ± 0,00 c	0,19 ± 0,00 d	4,9 ± 0,1 d
	95	0,09 ± 0,00 c	0,19 ± 0,00 d	5,2 ± 0,2 d
A10-Ca	50	0,34 ± 0,14 b	0,88 ± 0,05 a	15,0 ± 1,4 c
	60	0,88 ± 0,36 a	0,54 ± 0,01 b	76,0 ± 1,6 a
	70	0,73 ± 0,25 ab	0,54 ± 0,05 b	62,4 ± 16,5 ab
	80	0,11 ± 0,01 c*	0,22 ± 0,03 d*	3,9 ± 0,2 d
	90	0,08 ± 0,00 c	0,17 ± 0,01 d	6,0 ± 0,2 d
	95	0,08 ± 0,00 c	0,17 ± 0,01 d	5,4 ± 0,4 d

Dispersiones proteicas al 7,5% p/p con 15 mM de CaCl₂. Ciclo térmico en reómetro con velocidad de calentamiento y enfriamiento de 20 °C/min, con *plateau* de 20 min a temperatura variable, y etapa de enfriamiento hasta 20 °C. Promedio ± error estándar. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). (*: TC).

A partir de 80 °C, los valores de $\tan \delta$ al finalizar el *plateau* fueron entre 0,11 ± 0,01 y 0,08 ± 0,00, sin diferencias significativas al aumentar la temperatura ($p > 0,05$; Tabla 14), valores que resultaron los más bajos encontrados en el presente trabajo. Este cambio abrupto entre 70 y 80 °C pudo estar relacionado con que a 70 °C, si bien las interacciones hidrofóbicas se favorecen, al haberse aumentado la Td por la presencia de calcio (Td de A8 y A10 fueron 81,4 y 81,7 °C respectivamente), las proteínas no se encontraban desnaturalizadas, lo que limitó el grado de entrelazamiento. Luego de 20 min a 80 °C (y los ciclos de mayores temperaturas) la desnaturalización permitió la formación de una matriz más elástica, confirmando el rol de la desnaturalización como requisito para favorecer la gelificación. Como al aumentar la temperatura del *plateau* de 90 a 95 °C, los valores de los

módulos disminuyeron (Figura 13a), se concluye que las interacciones que se favorecieron entre las proteínas desnaturalizadas serían de tipo hidrofóbico. No se encontraron diferencias significativas entre A8 y A10 al finalizar la etapa de *plateau* a cada temperatura ($p > 0,05$; Figura 13a), lo que reforzaría la idea de que el calcio anuló las diferencias en hidrofobicidad inicial que presentaban ambos aislados.

Una vez finalizado el ciclo (20 °C), las interacciones aumentaron o se reforzaron incrementando considerablemente los módulos (Figura 13b), pero al igual que en las muestras sin calcio la $\tan \delta$ aumentó a causa de la etapa de enfriamiento en los ciclos a partir de 80 °C (Tabla 14). El crecimiento relativo de G' (Q), en los ciclos de bajas temperaturas (menores a 80 °C) fue alto, pero no suficiente para alcanzar valores de $\tan \delta$ menores a 0,3. En los ciclos de mayores temperaturas Q fue *ca.* 5, al igual que en los ciclos sin calcio (Tabla 8). Cuando las temperaturas máximas fueron 90 o 95 °C, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores de G' de A8 y A10 (Figura 13b), no así en los valores de $\tan \delta$ (Tabla 14). Se observó que la presencia de calcio reforzó la estructura de la matriz y a bajas concentraciones (7,5% p/p) las diferencias entre A8 y A10 se cancelaron a temperaturas menores o iguales a 80 °C, a mayores temperaturas (90 y 95 °C) las diferencias se evidenciaron (concordando con lo encontrado en la Sección anterior al variar la concentración). El efecto de la temperatura en las diferencias entre A8 y A10 fue opuesto a las muestras sin calcio.

4. Conclusiones parciales

La capacidad de formar geles de los APC es semejante a la de otras proteínas vegetales de reserva. Dado que en ambos aislados la gelificación comenzó antes de que se alcanzara un alto grado de desnaturalización, nuestros resultados sugieren que las proteínas de caupí presentan una importante capacidad de establecer interacciones entre sí.

Las modificaciones estructurales generadas por la extracción a pH 10,0 en las proteínas del aislado de caupí modificaron las propiedades de gelificación. En términos de concentración crítica, A10 necesitó menor concentración que A8 para formar un gel de determinadas características. A las menores temperaturas en que se formaron geles (70 y 80 °C) A10 generó geles más elásticos que A8, mientras que a las temperaturas más altas (90 y 95 °C) las diferencias entre A8 y A10 se cancelaron, probablemente por el mayor grado de desnaturalización.

Las condiciones de concentración proteica, temperaturas y velocidades de calentamiento afectaron el comportamiento reológico de las dispersiones. La matriz de los geles estuvo principalmente estabilizada por interacciones favorecidas por el enfriamiento como puentes de hidrógeno. Los valores de G' al final del ciclo sugieren que en las condiciones estudiadas de concentración proteica y fuerza iónica se pueden obtener geles de APC con buenas características reológicas con tratamientos térmicos a 80 °C, una temperatura relativamente baja para la gelificación de proteínas vegetales, lo que permitiría un ahorro de energía y podría favorecer la conservación de ciertos nutrientes.

El pre-tratamiento con APH provocó un proceso térmico de gelificación de APC más sensible a la concentración proteica. A bajas concentraciones el pre-tratamiento no favoreció la gelificación. En cambio a altas concentraciones (a partir de 10,5% p/p) el pre-tratamiento con APH permitió obtener geles térmicos a menores temperaturas (50 o 60 °C) a partir de ambos aislados. A estas concentraciones las APH generaron dispersiones con predominio del componente elástico sobre el viscoso (a causa de interacciones de tipo puente de hidrógeno) y el calentamiento permitió establecer interacciones hidrofóbicas logrando geles a menor tiempo y temperatura que las muestras sin presurizar, manteniendo las diferencias entre A8 y A10. El nivel de presión utilizado en el pre-tratamiento influyó en el grado de desnaturalización proteica obtenido y en el efecto sobre la gelificación. La desnaturalización parcial (400 MPa) mejoraría la elasticidad de los geles de A10 a cualquier temperatura ensayada, mientras que no afectó la elasticidad en A8. La desnaturalización completa (600 MPa) favorecería la elasticidad de los geles de A8 y A10 en ciclos con temperatura máxima de 70 y 80 °C. Dado que las APH favorecerían las interacciones que ocurren principalmente en la etapa de calentamiento de la gelificación térmica, se podrían emplear en estrategias de gelificación a temperaturas relativamente bajas (50 - 60 °C) y texturizar alimentos que se consumen en caliente.

La incorporación de calcio permitió obtener geles térmicos de APC a menor concentración proteica pero con ciclos térmicos a mayor temperatura. La presencia de calcio favoreció el establecimiento de interacciones que no necesitan alto grado de desnaturalización (interacciones tipo puente de calcio), pero para alcanzar una matriz viscoelástica suficiente para formar un gel se requirió la desnaturalización proteica para establecer interacciones durante el calentamiento (del tipo hidrofóbicas). A bajas concentraciones (7,5% p/p) las diferencias entre A8 y A10 se cancelaron a temperaturas menores o iguales a 80 °C, a mayor temperatura (90 y 95 °C) las diferencias se evidenciaron.

Capítulo III:

Caracterización de geles obtenidos por TT o por TAPH de A10. Efecto de la incorporación de calcio.

Selección de las condiciones experimentales

A partir de los resultados del Capítulo II concluimos que A10 presentaba mejores propiedades de gelificación que A8, ya que exhibió menor concentración crítica, menor temperatura crítica y mayores valores de los módulos G' y G'' . De esta manera, en este Capítulo se analizaron las características de dispersiones proteicas de A10 sometidas a TT o a TAPH, cada uno en dos niveles, 70 o 90 °C, y 400 o 600 MPa. Las temperaturas de los TT se eligieron por ser una inferior y otra superior a la temperatura de desnaturalización. Los niveles de presión para los TAPH fueron elegidos por alcanzar grados de desnaturalización en un caso alto y en el otro completo. En los cuatro casos, los tratamientos habían provocado cambios conformacionales importantes, que fueron descritos en el Capítulo I. En la primera parte del presente Capítulo se evaluó el efecto de la concentración proteica; en el rango de 7,5 a 13,5% p/p, donde se habían obtenido geles con el TT a 90 °C en el reómetro a una velocidad de calentamiento de 20 °C/min (Capítulo II). En la segunda parte del presente Capítulo, se estudió el efecto de la incorporación de calcio variando la concentración entre 0 y 40 mM, trabajando con la menor concentración proteica (7,5% p/p).

1. Dispersiones proteicas de A10 sometidas a TT o TAPH

1.1. Comportamiento reológico

Se analizó el efecto de la concentración proteica para cada tratamiento realizando barridos de frecuencia en el rango de viscoelasticidad lineal de las dispersiones, luego de un almacenamiento a 4 °C durante 12 h. Se evaluaron los espectros mecánicos (G' y G'' en función de la frecuencia) y los parámetros G' y $\tan \delta$ a 1 Hz.

Clark y Ross-Murphy (1987) describen un espectro mecánico típico de gel como aquel en que al graficar en escala logarítmica los módulos en función de la frecuencia, se obtienen dos líneas prácticamente horizontales, siendo G' de magnitud mayor a G'' en 1 o 2 órdenes logarítmicos, y ambos muestran un leve aumento a las mayores frecuencias. Los geles débiles muestran mayor dependencia con la frecuencia. La frecuencia del ensayo es inversamente proporcional al tiempo durante el cual se aplica la deformación ($\omega = 1/t$), es por ello que a menor frecuencia, mayor es el tiempo de deformación, por lo que se pueden romper interacciones intermoleculares, dando valores de G' y G'' más bajos (Renkema y

van Vliet, 2002). Por otro lado, cuando no se llega a las condiciones necesarias para la gelificación, se puede calificar a las dispersiones proteicas como dispersiones o soluciones entrelazadas, las cuales presentan un espectro mecánico con G' menor a G'' para la mayor parte del rango de frecuencias, gran dependencia con la frecuencia y se puede encontrar un punto de cruce entre los módulos (Mooney *et al.*, 1959; Clark y Ross Murphy, 1987). Para evaluar la dependencia de los módulos G' y G'' con la frecuencia, los espectros mecánicos se ajustaron a un modelo potencial (o ley de la potencia): $G' = G'^* f^n$ y $G'' = G''* f^m$, siendo G'^* y $G''*$ los módulos cuando la frecuencia (f) es 1 Hz y los exponentes n y m representan la dependencia con la frecuencia.

En la Figura 1 se muestran los espectros obtenidos y en la Tabla 1 los parámetros del ajuste al modelo potencial de las dispersiones tratadas de A10 a diferentes concentraciones con los diferentes tratamientos. A baja concentración (7,5% p/p) no se obtuvieron geles con ninguno de los tratamientos aplicados. Las dispersiones sometidas a TT mostraron espectros mecánicos característicos de las soluciones entrelazadas (Figura 1a y b); a baja frecuencia G' fue menor a G'' y a altas frecuencias esta relación se invirtió. Las dispersiones tratadas con APH mostraron espectros de muy bajo módulo elástico, incluso algunos valores de G' no fueron detectados por el reómetro. Solo en la dispersión al 7,5%, tratada con 400 MPa, se observó el punto de cruce entre los módulos G' y G'' (Figura 1c), característico de solución entrelazada como definieron Mooney *et al.*, (1959) y Clark y Ross Murphy (1987). A otras concentraciones también se obtuvieron espectros de soluciones entrelazadas por TAPH pero no se encontraron puntos de cruce entre los módulos, el valor de G' fue muy bajo a todas las frecuencias (Figura 1d, g, h, y k). Para las soluciones entrelazadas los exponentes n y m tomaron valores entre $2,25 \pm 0,34$ y $0,94 \pm 0,00$, en las muestras con TAPH se observó que a medida que aumentó la concentración proteica disminuyeron significativamente los exponentes ($p < 0,05$) (Tabla 1). Los espectros típicos de geles se obtuvieron por TT a partir de 9,0% p/p a 90 °C y a partir de 10,5% p/p a 70 °C (Figura 1f, y i, respectivamente). En las muestras con TAPH, los espectros de geles solo se obtuvieron a partir de 12,0% p/p a 600 MPa y a 13,5% p/p a 400 MPa (Figura 1p y s, respectivamente). A partir de dichas concentraciones, la dependencia de los módulos con la frecuencia fue menor y los exponentes n y m tomaron valores entre $0,57 \pm 0,01$ y $0,08 \pm 0,01$. El aumento de la concentración proteica disminuyó significativamente el valor de los exponentes ($p < 0,05$) (Tabla 1).

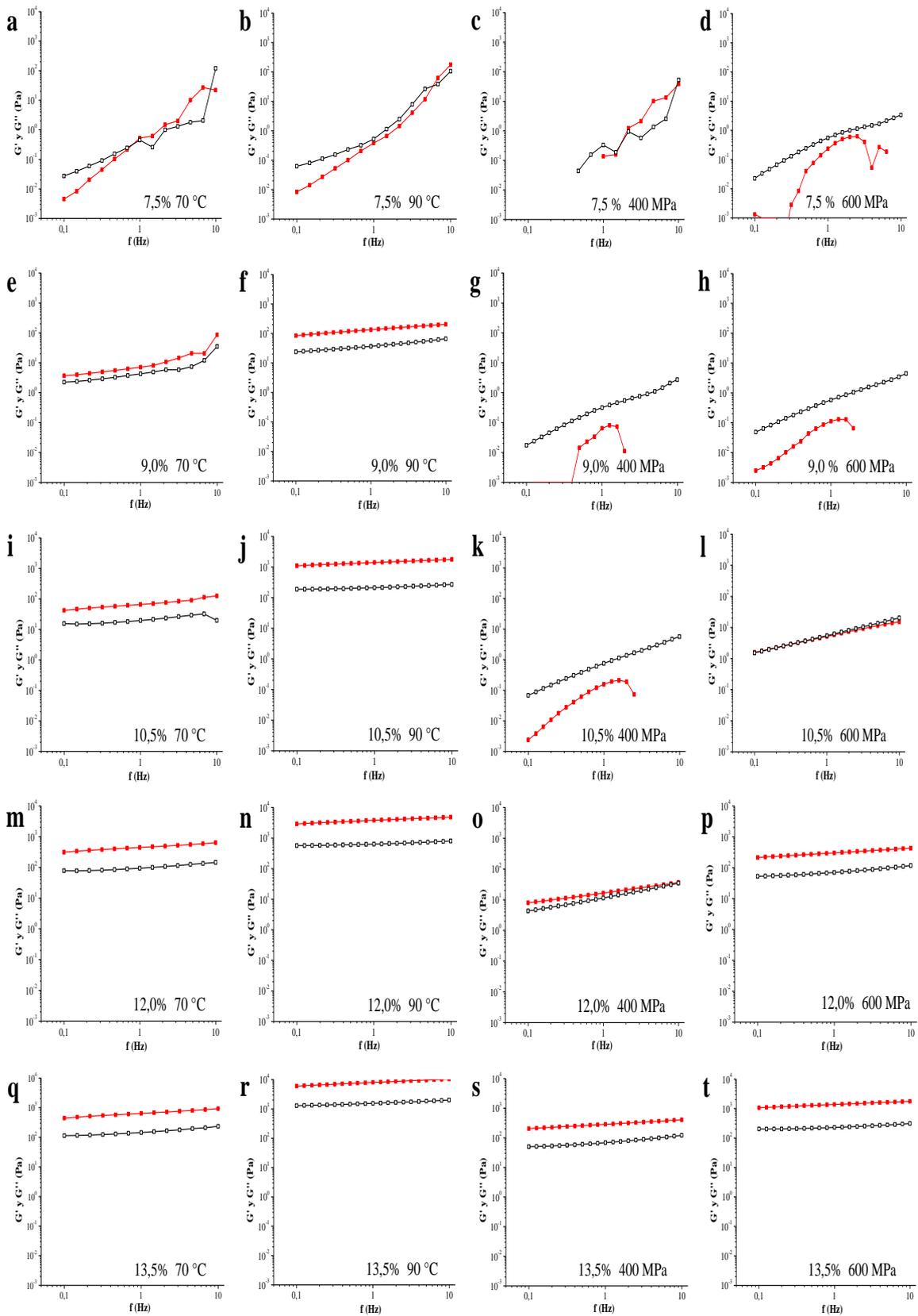


Figura 1: Espectros mecánicos de dispersiones proteicas de A10 a diferentes concentraciones (de 7,5 a 13,5% p/p) sometidas a TT: **a, e, i, m y q**, a 70 °C y **b, f, j, n y r**, a 90 °C; o a TAPH: **c, g, k, o y s** a 400 MPa y **d, h, l, p y t** a 600 MPa. G' (■) G'' (□).

Tabla 1: Ajuste al modelo potencial de los módulos G' y G'' en función de la frecuencia (f) ($G' = G'^* f^n$ y $G'' = G''^* f^m$).

	%	G'^*	n	R^2	G''^*	m	R^2
70 °C	7,5	0,42 ± 0,00f	1,60 ± 0,31bc	0,9558	0,35 ± 0,01e	1,41 ± 0,06ab	0,9020
	9,0	9 ± 1f	0,55 ± 0,05e	0,8370	5 ± 0e	0,45 ± 0,06ef	0,7778
	10,5	68 ± 5ef	0,22 ± 0,01efg	0,9721	21 ± 2e	0,18 ± 0,01fg	0,9260
	12,0	447 ± 118de	0,15 ± 0,00efg	0,9972	99 ± 22de	0,14 ± 0,00fg	0,9432
	13,5	643 ± 36d	0,15 ± 0,00efg	0,9979	151 ± 5cd	0,16 ± 0,00fg	0,9692
90 °C	7,5	0,47 ± 0,09f	2,00 ± 0,28ab	0,9474	0,85 ± 0,18e	1,46 ± 0,57a	0,8248
	9,0	133 ± 25ef	0,19 ± 0,01efg	0,9990	38 ± 4e	0,20 ± 0,02efg	0,9958
	10,5	1322 ± 92c	0,10 ± 0,00g	0,9991	204 ± 12c	0,08 ± 0,00g	0,9626
	12,0	3796 ± 121b	0,11 ± 0,00fg	0,9989	648 ± 22b	0,08 ± 0,00g	0,9634
	13,5	7962 ± 329a	0,12 ± 0,00fg	0,9992	1567 ± 98a	0,10 ± 0,00fg	0,9900
400 MPa	7,5	0,27 ± 0,16f	2,25 ± 0,34a	0,9801	0,27 ± 0,09e	1,56 ± 0,21a	0,8627
	9,0	0,04 ± 0,02f	1,18 ± 0,18d	0,5999	0,25 ± 0,01e	1,04 ± 0,01bc	0,9882
	10,5	0,08 ± 0,04f	1,21 ± 0,16cd	0,7947	0,68 ± 0,06e	0,94 ± 0,00cd	0,9976
	12,0	19 ± 2f	0,33 ± 0,03efg	0,9956	12 ± 1e	0,44 ± 0,01ef	0,9987
	13,5	276 ± 9def	0,15 ± 0,00efg	0,9994	70 ± 2de	0,19 ± 0,01fg	0,9742
600 MPa	7,5	0,09 ± 0,01f	1,80 ± 0,24b	0,8059	0,40 ± 0,01e	1,04 ± 0,01bc	0,9726
	9,0	0,05 ± 0,02f	1,02 ± 0,21d	0,6445	0,52 ± 0,00e	0,96 ± 0,00c	0,9951
	10,5	5 ± 0f	0,49 ± 0,02ef	0,9935	5 ± 0e	0,57 ± 0,01de	0,9999
	12,0	294 ± 28def	0,16 ± 0,01efg	0,9998	71 ± 5de	0,18 ± 0,01fg	0,9793
	13,5	1374 ± 14c	0,11 ± 0,00fg	0,9996	235 ± 5c	0,09 ± 0,00fg	0,9507

Parámetros correspondientes a los espectros mecánicos de la Figura 1 de dispersiones proteicas de A10 a diferentes concentraciones (% p/p) sometidas a TT (70 o 90 °C) o TAPH (400 o 600 MPa). Promedio ± error estándar. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Para cada muestra n fue mayor que m , indicando que G' dependió más de la frecuencia que G'' en todos los casos. Renkema y van Vliet (2002) y Renkema *et al.* (2002) atribuyen esta dependencia de G' con la frecuencia a ruptura de interacciones moleculares débiles y reordenamiento de la matriz, característico de geles débiles. Por lo tanto, a medida que disminuye la dependencia con la frecuencia (el exponente n tiende a cero) la estructura de los geles estaría establecida por enlaces más fuertes, o bien por un mayor número de enlaces, donde no se producen reordenamientos, comportamiento característico de geles fuertes que soportan mayor deformación.

En la Figura 2 se presentan fotografías de las dispersiones y los geles obtenidos y sus respectivos valores de $\tan \delta$ a 1 Hz (viscoelasticidad). Para las concentraciones a las cuales se obtuvieron espectros mecánicos típicos de geles se cumplió que la $\tan \delta$ fue menor a 0,3 (definición arbitraria de concentración crítica que se adoptó en el Capítulo II), para espectros típicos de soluciones entrelazadas la $\tan \delta$ fue mayor a uno y para los casos de geles débiles (9,0% a 70 °C, 10,5% a 600 MPa y 12,0% a 400 MPa) la $\tan \delta$ tomó valores entre 1 y 0,6. Se obtuvieron geles auto-portantes a diferentes concentraciones según el tratamiento aplicado; en el caso de APH a 400 MPa solamente a 13,5%, a 600 MPa a partir de 12,0%, mientras que en el caso de los TT, desde 10,5%, condiciones en las cuales se encontraron los menores valores de $\tan \delta$ y del exponente n (Figura 2 y Tabla 1). Comparando los geles auto-portantes al 13,5%, se encontró que el de menor $\tan \delta$ y menor n ($0,16 \pm 0,00$ y $0,11 \pm 0,00$, respectivamente) se obtuvo con el TAPH a 600 MPa, seguido del TT a 90 °C ($0,19 \pm 0,00$ y $0,12 \pm 0,00$) ($p < 0,05$), mientras que a 70 °C y 400 MPa estos parámetros tomaron valores mayores ($0,24 \pm 0,01$ y $0,15 \pm 0,00$) sin diferencias significativas entre estos tratamientos ($p > 0,05$).

Los valores del módulo G' a 1 Hz en función de la concentración proteica y para cada tratamiento se muestran en la Figura 3 y coincidieron con los obtenidos con el ajuste de los espectros al modelo potencial (G'^*) de la Tabla 1. Los mayores valores de G' se encontraron para 12,0 y 13,5% p/p con el tratamiento a 90 °C. En ambos tipos de tratamiento se observó un efecto del nivel, encontrándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre 70 y 90 °C a partir de 10,5% p/p y entre 400 y 600 MPa a partir de 12,0% p/p. En principio este efecto del nivel se debería a los mayores grados de desnaturalización alcanzados con 90 °C y 600 MPa que permitirían mayores números de interacciones. También contribuiría a este efecto, en el caso de la desnaturalización por TT, haber alcanzado una temperatura (60 - 80 °C) a la que las interacciones hidrofóbicas se maximizan (Myers, 1990). En la Sección 1.2.2. del Capítulo II se informó que los mayores

valores de G' se obtuvieron al superar los ciclos con *plateau* de 80 °C. A 7,5 y 9,0% p/p G' tuvo los menores valores sin diferencias significativas para los distintos tratamientos. A partir de 10,5% p/p el valor de G' alcanzado a 90 °C se diferenció significativamente ($p < 0,05$) de los otros tratamientos. A la mayor concentración ensayada (13,5% p/p) el valor de G' fue mayor con el tratamiento a 600 MPa que con el tratamiento a 70 °C ($p < 0,05$), presentando un valor sin diferencias significativas al alcanzado con el TT a 90 °C a 10,5% p/p (Tabla 1). Los altos valores de concentración requeridos en las muestras con TAPH para alcanzar espectros típicos de geles (valores bajos de n y m y de $\tan \delta$) y altos valores de G' indican que este tipo de tratamiento hace necesaria una mayor concentración de proteína en comparación a los TT para generar una matriz tridimensional elástica.

En el inserto de la Figura 3 se presenta el exponente b del ajuste de G' en función de la concentración proteica (C) al modelo de la ley de la potencia ($G' = a C^b$). Para los TT el rango de concentración proteica fue 7,5 a 13,5% p/p para los TT y de 10,5 a 13,5% p/p para los TAPH. Los TT no presentaron diferencias significativas entre sus exponentes b , los cuales fueron menores a los de los TAPH. El exponente b para los TAPH presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los niveles de presión aplicados. Como se mencionó en el Capítulo II este exponente da idea de la habilidad de las proteínas para formar la matriz del gel. Cuanto menor es b , las proteínas tendrían mayor capacidad de interactuar entre sí, siendo más independientes de la concentración proteica para obtener una matriz más elástica. Estos resultados indican que los TT fueron más eficientes que los TAPH para generar matrices estructuradas.

Las diferencias entre los tipos de tratamientos para lograr la gelificación podrían deberse a diferentes fenómenos. Por un lado el aumento de la temperatura en los TT aumenta la velocidad de los movimientos brownianos de las moléculas, lo que podría favorecer las interacciones entre ellas a causa del aumento de las colisiones. Por el contrario, en el caso de los TAPH, el sistema se haría más ordenado durante el tratamiento (principio de ordenamiento microscópico, Balny y Masson, 1993) sin aumento del movimiento browniano. En la Sección 2.2.2. del Capítulo I se observó, en relación al efecto *in situ* de las APH, que el desplegamiento de las proteínas se daba durante la etapa de compresión, mientras que durante la descompresión las moléculas proteicas se reorganizaban plegándose o bien interactuando entre ellas para formar agregados. La mayor concentración y proximidad entre las moléculas podría ser el factor clave para que las interacciones entre las moléculas se dieran en forma ordenada durante la descompresión, generando una matriz viscoelástica de gel.

	7,5%	9,0%	10,5%	12,0%	13,5%
70 °C					
tan δ	0,84 ± 0,12a	0,60 ± 0,04d	0,29 ± 0,01e	0,20 ± 0,00gh	0,22 ± 0,01fg
90 °C					
tan δ	1,35 ± 0,02a	0,28 ± 0,02e	0,15 ± 0,001i	0,17 ± 0,001i	0,19 ± 0,00h
400 MPa					
tan δ	2,92 ± 0,72a	5,64 ± 1,08a	6,28 ± 1,66a	0,70 ± 0,03c	0,24 ± 0,01f
600 MPa					
tan δ	2,33 ± 0,09a	4,38 ± 0,18a	1,07 ± 0,02b	0,23 ± 0,00fg	0,16 ± 0,00i

Figura 2: Fotografías de dispersiones y geles de A10 a diferentes concentraciones proteicas (7,5; 9,0; 10,5; 12,0; 13,5% p/p de proteína) sometidas a TT (70 o 90 °C) o a TAPH (400 o 600 MPa). Debajo de cada fotografía se informa el promedio ± el error estándar de la viscoelasticidad (tan δ a 1 Hz). Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

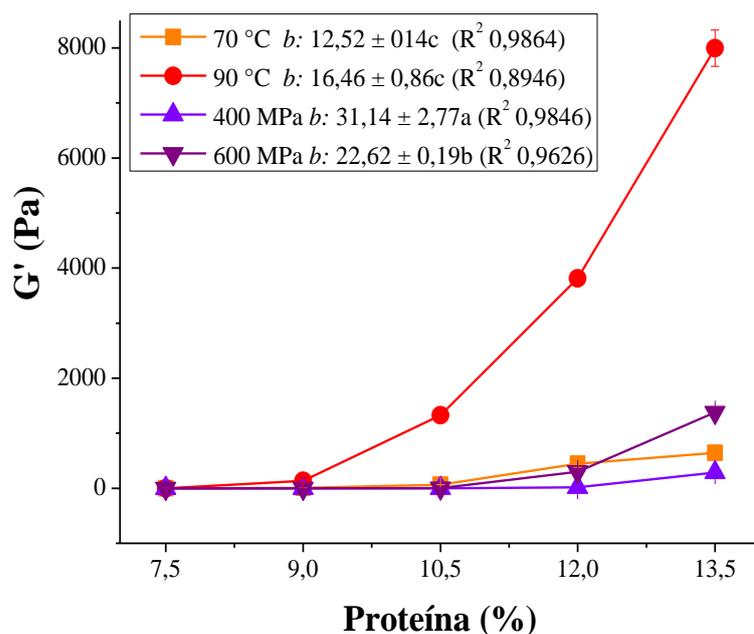


Figura 3: Módulo elástico (G') en función de la concentración proteica, ajuste al modelo de la ley de la potencia: $G' = a C^b$. Geles de A10 obtenidos a partir de TT (70 o 90 °C) o TAPH (400 o 600 MPa). Modelo ajustado para un rango de concentración proteica de 7,5 a 13,5% p/p para los TT y de 10,5 a 13,5% p/p para los TAPH. Promedio \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cabe destacar que los valores de G' y de $\tan \delta$ a 1 Hz obtenidos con el tratamiento a 90 °C en las condiciones experimentales descritas en este Capítulo fueron diferentes a los obtenidos en las condiciones descritas en el Capítulo anterior. El módulo elástico fue mayor para cada concentración cuando el TT se realizó en el reómetro que cuando se realizó en el baño termostático. Además, la $\tan \delta$ fue menor a 0,3 a un nivel de concentración menor en los ensayos realizados en el reómetro. De esta manera la concentración crítica de gelificación fue 7,5 y 9,0% p/p, para el reómetro y para el baño termostático respectivamente. Estas diferencias pudieron deberse a distintos factores, entre ellos: las diferentes geometrías del reómetro (cilindro de 1 mm de altura y 40 mm de diámetro) y del tubo que se sumergía en el baño (cilindro de 50 mm de altura y 15 mm de diámetro), y el hecho de que la muestra estuviera en contacto directo con la fuente de calor (reómetro) o separada por el vidrio (baño termostático). Estos factores condicionaron la transferencia de calor. Por otra parte cuando el gel se formó en el reómetro, no sufrió ningún esfuerzo antes de ser analizado, mientras que los geles formados en el baño termostático fueron desmoldados y analizados en el reómetro, lo que pudo modificar en parte su estructura. Además, los geles de este Capítulo fueron analizados luego de almacenarlos 12 h a 4 °C.

1.2. Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua (WHC) está directamente relacionada con el tipo de matriz formada en el gel. La retención de agua se produce por interacciones como puente de hidrogeno entre las proteínas de la matriz y el agua y por capilaridad. Geles con una matriz ordenada y compacta presentan alta WHC, mientras que geles con una matriz gruesa, desordenada y abierta no pueden retener agua y presentan baja WHC (Hermansson, 1986; Puppo y Añón, 1998). En la Tabla 2 se muestran los valores de WHC en función de la concentración proteica. A las dispersiones entrelazadas y geles débiles que se obtuvieron luego del tratamiento aplicado se les asignó el valor de cero, ya que luego de la centrifugación fluyeron completamente sin separación de fases, lo que podría deberse a ruptura de la matriz proteica. Las muestras que formaron geles más fuertes exhibieron valores de WHC mayores al 90%. Se realizó un análisis factorial (considerando tratamiento y concentración proteica como factores y su interacción) a las concentraciones más altas (12,0 y 13,5% p/p) donde todos los tratamientos formaron geles. El análisis estadístico indicó que no fueron significativos los factores tratamiento y concentración proteica presentando todos los geles alta WHC sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$) (Tabla 2).

Tabla 2: WHC de geles proteicos de A10 obtenidos por TT o TAPH a diferentes concentraciones proteicas.

Concentración % (p/p)	70 °C	90 °C	400 MPa	600 MPa
7,5	0	0	0	0
9,0	0	95,68 ± 0,06	0	0
10,5	96,32 ± 1,55	96,54 ± 0,38	0	0
12,0	98,31 ± 0,33a	97,05 ± 0,65a	98,25 ± 0,19a	98,89 ± 0,12a
13,5	99,46 ± 0,28a	99,48 ± 0,08a	98,83 ± 0,23a	99,07 ± 0,06a

TT a 70 o 90 °C y TAPH a 400 o 600 MPa. El valor cero indica que la muestra fluyó completamente sin separación de fases. Promedio ± error estándar, letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p > 0,05$).

En las muestras con TT, donde se obtuvieron geles en un rango de concentración más amplio, se pudo ver que a medida que aumentó la concentración proteica WHC fue mayor (Tabla 2). Los geles de mayor concentración proteica retienen más agua debido a una red más densa, con poros más pequeños con mayor contribución de la capilaridad y más sitios para interactuar en forma específica con el agua (Remondetto *et al.*, 2002). Dado que las condiciones de centrifugación fueron muy enérgicas (10000 xg 20 min 20 °C), estos resultados indican que los geles obtenidos a partir de A10, tanto por TT como por TAPH, desarrollaron una excelente interacción entre el agua y la matriz proteica. Cabe aclarar que durante la caracterización de estos geles no se observó sinéresis espontánea (Figura 2).

1.3. Propiedades de Color

La importancia del color en el ámbito de la tecnología de los alimentos radica en su condición de indicador de calidad. Es una característica que influye en la aceptación por parte del consumidor y tiene una peculiaridad importante: su apreciación siempre se realiza en primer término (Calvo y Duran, 2002). Visualmente, todos los geles presentaron tonalidades cercanas a un color marrón/ámbar (Figura 2). Los parámetros de color CIELab a^* y b^* se asociaron a los colores rojos y amarillos, respectivamente, por presentar valores positivos (Figura 4). El aumento de la concentración mostró una disminución del parámetro a^* ($p < 0,05$, a partir de 10,5%), pero no modificó significativamente b^* . Por otro lado, los tratamientos aplicados afectaron significativamente estos parámetros ($p < 0,05$). Las dispersiones tratadas con 400 MPa presentaron los mayores valores de a^* , seguidas por las tratadas a 70 °C y las de 90 °C y 600 MPa, que tuvieron los menores valores sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$, Figura 4). Las diferencias a causa de los tratamientos en el parámetro b^* fueron más notorias, siendo las dispersiones tratadas a 90 °C las de mayor valor y las tratadas a 600 MPa las de menor; sin diferencias significativas entre las de 70 °C y 400 MPa ($p > 0,05$, Figura 4). Se calculó el parámetro *hue* (H^*), representando los parámetros a^* y b^* como vectores con un determinado ángulo, indicando el tono de color. Calculando el promedio de todas las dispersiones a las diferentes concentraciones para un mismo tratamiento, se encontró que las dispersiones tratadas a 90 °C presentaron un ángulo de $58,51 \pm 0,39^\circ$ que se diferenció significativamente ($p < 0,05$) de las otras que presentaron ángulos de $46,35 \pm 2,15^\circ$ para 70 °C y $40,49 \pm 2,51^\circ$ y $40,14 \pm 1,57^\circ$ para 400 y 600 MPa respectivamente. Estas diferencias indicarían que los TT

(principalmente a 90 °C) produjeron geles con diferentes tonalidades (más amarillentas y menos rojizas) que los obtenidos con TAPH. El parámetro *chroma* (C*) representa la saturación del color, todos los geles presentaron valores entre $7,09 \pm 0,73$ y $8,19 \pm 0,63$ sin diferencias significativas por la variación de la concentración y con los tratamientos excepto el tratamiento a 600 MPa que presentó los menores valores ($p < 0,05$) a cada concentración. Las variaciones en los colores a causa de los distintos tratamientos podrían deberse a la modificación de sustancias presentes en los aislados que influyen en el color, como por ejemplo taninos, los cuales son afectados por los TT, pero muy poco por los TAPH por ser moléculas pequeñas (Avanza *et al.*, 2013; O'Reilly *et al.*, 2001).

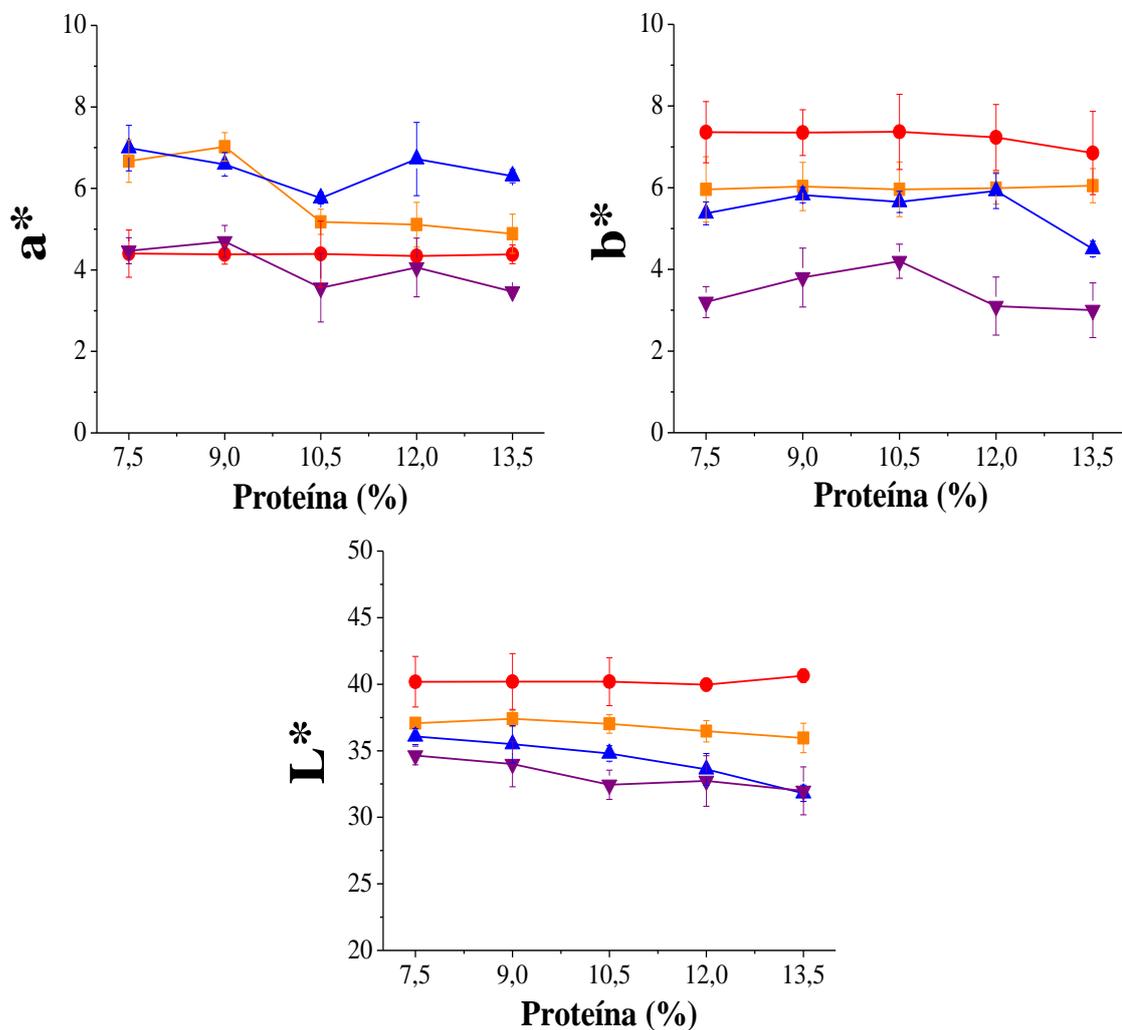


Figura 4: Parámetros de color CIELab (a*, b* y L*) en función de la concentración proteica de dispersiones de A10 sometidas a TT (70 (■) o 90 °C (●)) o a TAPH (400 (▲) o 600 MPa (▼)). Promedio \pm errores estándar.

El parámetro L^* toma valores desde el cero (negro) al 100 (blanco) y se puede usar como un indicador del nivel de agregación de las proteínas que forman el gel. Se ha demostrado que la blancura y opacidad del gel están relacionadas con el tamaño de partícula (Doi, 1993; Chantrapornchai y McClements, 2002). Un gel opaco presenta mayor valor de L^* , porque los agregados de proteínas más grandes dispersan más luz que las partículas más pequeñas. Los geles de A10 presentaron valores de L^* entre 31 y 40, visualmente de aspectos translucidos más que opacos y sin indicios de blancura (Figura 2). Para geles de aislado proteico de amaranto se encontraron valores de L^* entre *ca.* 75 y 72 según la concentración proteica (Avanza *et al.*, 2005). El aumento de la concentración proteica no provocó cambios significativos ($p > 0,05$) en los valores de L^* , pero se observó una leve tendencia a la disminución (Figura 4). La disminución en el parámetro L^* con el aumento de la concentración proteica fue informado por Avanza *et al.* (2005) en geles de aislados proteicos de amaranto y por Maltais *et al.* (2005) en geles de proteínas de soja, atribuyendo al aumento de interacciones proteína-proteína. Con respecto a los diferentes tratamientos empleados, los TT presentaron los mayores valores de L^* en función de la temperatura empleada (promedio entre las concentraciones de $40,23 \pm 0,11$ para $90\text{ }^\circ\text{C}$ y $36,78 \pm 0,25$ para $70\text{ }^\circ\text{C}$; $p < 0,05$), indicando geles más opacos. Entre los TAPH no se encontraron diferencias significativas al aumentar el nivel de presión ($34,35 \pm 0,76$ y $33,16 \pm 0,50$ para 400 y 600 MPa respectivamente; $p > 0,05$). Al observar solo diferencias significativas por el tipo de tratamiento empleado y no por el aumento de la concentración proteica (en este rango de concentraciones) la variación de L^* podría deberse a diferencias en el tipo de interacciones a causa de los diferentes tratamientos más que en el número de ellas.

1.4. Naturaleza de las interacciones proteicas de la matriz

Para estudiar la naturaleza de las interacciones involucradas en la estabilización de la matriz proteica se analizó la solubilidad en *buffer* salino (BS) con agentes desnaturizantes como SDS y/o urea. La solubilidad en BS sin agentes desnaturizantes puede interpretarse como la liberación de proteínas no asociadas o débilmente unidas a la red, como interacciones electrostáticas débiles que se desestabilizan por la baja concentración de sales (Puppo *et al.*, 1995). El SDS es un detergente aniónico que se une a las proteínas a través de enlaces no covalentes, causando repulsión iónica y desplegando los polipéptidos desestabilizando interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. La urea

interfiere principalmente en las interacciones de tipo puente de hidrógeno e hidrofóbicas entre las cadenas polipeptídicas, afectando de un modo directo al formar enlaces puente de hidrógeno con los aminoácidos polares y solvatando los aminoácidos no polares (Gálvez Mariscal *et al.*, 2013). Se considera que al utilizar simultáneamente SDS y urea, se desestabilizan todas las interacciones no covalentes (Shimada y Cheftel, 1988; Puppo *et al.*, 1995; Avanza *et al.*, 2005).

En esta Sección se caracterizaron las interacciones proteicas en las diferentes matrices obtenidas con los distintos tratamientos y a tres concentraciones: 7,5; 10,5 y 13,5% p/p. En la Sección 1.1. de este Capítulo se encontró que al 7,5% p/p se obtuvieron soluciones entrelazadas con todos los tratamientos aplicados, al 10,5% se obtuvieron geles con los TT y soluciones entrelazadas con los TAPH y al 13,5% todos los tratamientos provocaron la gelificación de A10. En todas las dispersiones proteicas estudiadas la solubilidad en BS disminuyó significativamente con el aumento de la concentración proteica y aumentó significativamente con el agregado de agentes desnaturizantes ($p < 0,05$, Figura 5a, b y c). La disminución de la solubilidad en BS a causa del aumento de la concentración proteica indicaría un mayor número de interacciones proteína-proteína y menor proporción de proteínas libres o débilmente unidas a la red. Como la disminución de la solubilidad en los medios con agentes desnaturizantes también se observó al aumentar la concentración, podría indicar no solo aumento del número de interacciones proteína-proteína si no también aumento de interacciones de tipo covalente. La magnitud del aumento de la solubilidad por el agregado de los agentes desnaturizantes o la disminución de la misma a causa del aumento de la concentración dependió del tratamiento aplicado a las dispersiones, indicando diferentes predominios de interacciones no covalentes según el tratamiento. Por lo tanto, se analizó el efecto del factor agente desnaturizante, tratamiento y la interacción entre ellos a cada concentración por separado, siendo significativo ($p < 0,05$) el efecto de cada uno. El ANOVA que se presenta en la Figura 5 fue realizado para cada panel (a, b o c) por separado.

En las muestras preparadas con la menor concentración (7,5% p/p) la solubilidad en BS fue mayor cuanto menor fue el nivel del tratamiento aplicado y a la vez fue mayor con los tratamientos de APH (70 y 65% para 400 y 600 MPa respectivamente), que con los TT (58 y 51% para 70 y 90 °C respectivamente, Figura 5a), lo que indicaría mayor cantidad de proteínas unidas débilmente a la red cuando las condiciones de tratamientos fueron menos intensas. En cualquiera de los cuatro casos el porcentaje de proteína extraída con BS fue mayor al 50%, hecho que fue coherente con que a esta concentración proteica todos los

tratamientos formaron dispersiones entrelazadas (Figura 1 de la Sección 1.1 del presente Capítulo). Con el agregado de SDS o urea, la solubilidad aumentó en todas las dispersiones (entre 73 y 86% con SDS y entre 79 y 88% con urea). Cuando se agregan los dos agentes desnaturizantes juntos la solubilidad alcanzó valores entre 92 y 96%, indicando un predominio de uniones no covalentes y un pequeño porcentaje de uniones covalentes, como puentes disulfuro, pero sin diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 5a).

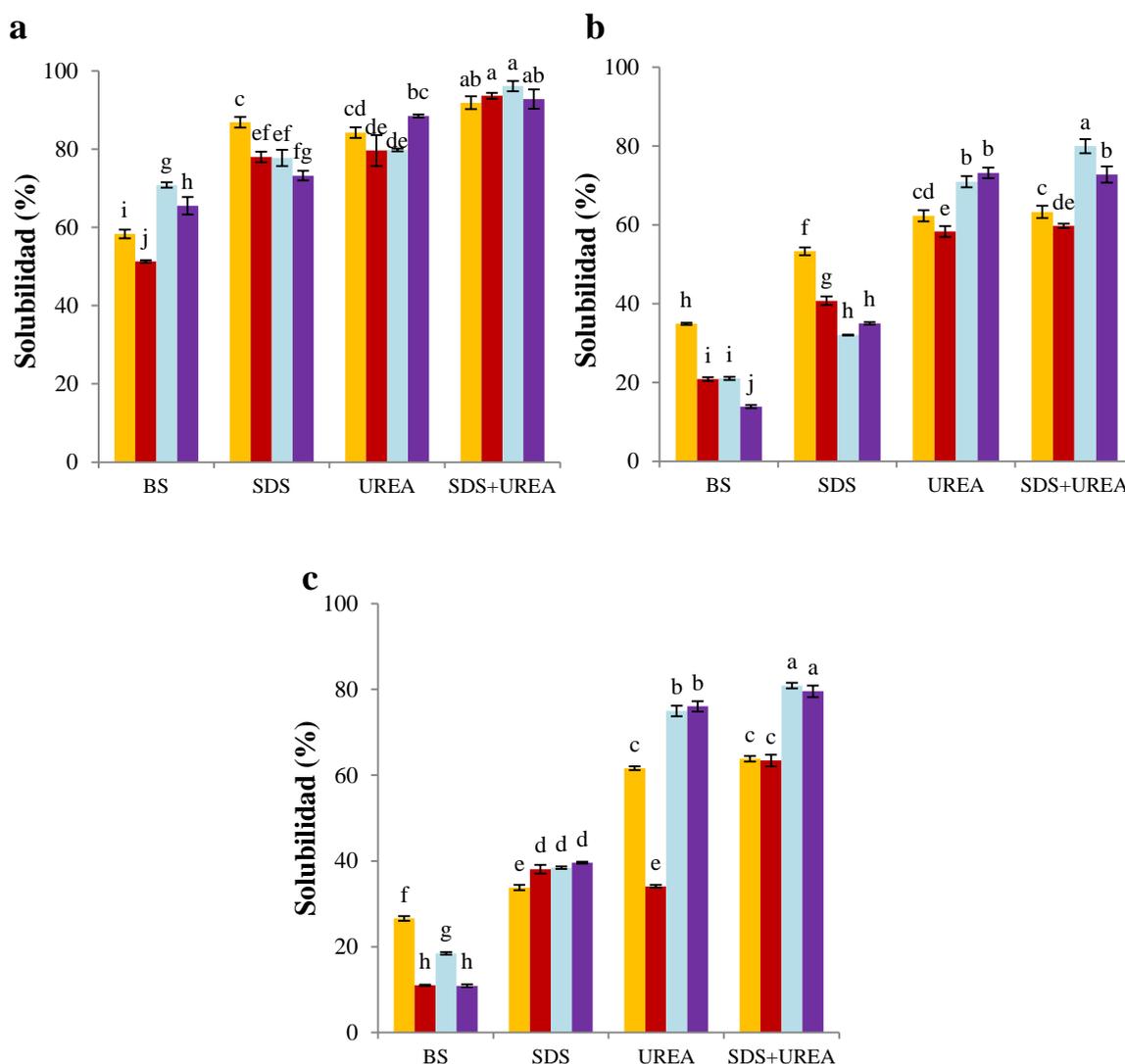


Figura 5: Solubilidad proteica (%) en *buffer* salino (BS) o en BS con agentes desnaturizantes SDS y/o UREA, de dispersiones de A10 al 7,5 (a); 10,5 (b) o 13,5% p/p (c) sometidas a TT (70 °C ■ y 90 °C ■) o a TAPH (400 MPa ■ y 600 MPa ■). Promedio ± error estándar. Letras distintas en cada panel indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

A la concentración de 10,5% p/p con los TT se obtuvieron geles, pero con los tratamientos con APH, nuevamente soluciones entrelazadas (Figura 1). En los geles térmicos se observó menor solubilidad en todos los medios (BS sin y con agregado de agentes desnaturalizantes) cuando la temperatura del TT fue mayor (90 con respecto a los de 70 °C) (Figura 5b), lo cual sugiere mayor número de interacciones a causa de mayor desnaturalización proteica alcanzada a la mayor temperatura. La incorporación de urea aumentó significativamente la solubilidad de los geles térmicos con respecto a la adición de solo SDS, pero la solubilidad no aumentó significativamente por el agregado de los dos agentes juntos. La solubilidad con SDS y urea fue de solo el 63 y 60% para 70 y 90 °C, respectivamente (Figura 5b), demostrando una importante contribución de enlaces covalentes que insolubilizó la red proteica. En las soluciones entrelazadas obtenidas por TAPH, las solubilidades en los diferentes medios fueron menores que las de las dispersiones entrelazadas de menor concentración (7,5%) (Figura 5a y b). A pesar de no formar geles, estas dispersiones tuvieron una alta proporción de proteína involucrada en este sistema entrelazado (la solubilidad en BS fue 21 y 14% para 400 y 600 MPa respectivamente (Figura 5b). Por otro lado, se observó un importante aumento de la solubilidad cuando se agregó solo urea (de 35 - 32% con SDS a 73 - 70% con urea), lo que podría indicar un predominio de puentes de hidrógeno, interacciones promovidas por los TAPH (Boonyaratanakornkit *et al.*, 2002). La contribución de puentes disulfuro fue mayor cuando se aplicó 600 MPa que 400 MPa (72 y 80% de solubilidad en SDS y urea, respectivamente, Figura 5b).

Al 13,5% se obtuvieron geles con todos los tratamientos (Figura 1). La solubilidad de los geles en BS disminuyó significativamente al aumentar el nivel del tratamiento, (de 70 a 90 °C o de 400 a 600 MPa, Figura 5c), demostrando que aumentaron las interacciones proteína-proteína que formaban la red y disminuyó la cantidad de proteínas débilmente unidas a la misma. La solubilidad aumentó al agregar los agentes desnaturalizantes, y fue significativamente mayor en BS + urea que en BS + SDS (Figura 5c). Se puede destacar que la solubilidad con urea fue significativamente mayor y sin diferencias significativas entre 400 y 600 MPa en los geles con APH (75 - 76%), frente a la de los geles térmicos (62% para 70 °C y 34% para 90 °C), corroborando el predominio de interacciones puente de hidrógeno cuando se aplicaron los TAPH. Las interacciones covalentes del tipo puente disulfuro, predominarían en los geles térmicos frente a los de APH, ya que la solubilidad de los geles térmicos fue menor que los geles obtenidos por APH en el *buffer* con ambos agentes desnaturalizantes (Figura 5c).

Estos resultados podrían relacionarse con las diferencias encontradas en el parámetro L^* de color de las muestras tratadas con TT o con TAPH. Los TT favorecerían mayor cantidad de enlaces puente disulfuro dando geles con mayor valor de L^* , mientras que los TAPH favorecería interacciones puente de hidrógeno dando geles con menor valor de L^* .

1.5. Microestructura de la matriz proteica

La microscopia electrónica de barrido es una herramienta complementaria para el análisis de la estructura de los geles proteicos (Heertje, 1993). Mediante esta técnica se puede conocer la forma y grosor de los filamentos proteicos, el tamaño de poro de la matriz y distinguir los agregados y espacios ocupados por solvente (Pilosof, 2000b). En esta Sección se trabajó con las mismas concentraciones empleadas en la Sección anterior (7,5; 10,5 y 13,5% p/p) para relacionar la microestructura de la red formada con la naturaleza de las interacciones proteicas.

Para cada tratamiento se observó que a medida que aumentó la concentración proteica se produjo una disminución del tamaño de poro, con una matriz más compacta que pudo ser consecuencia de una mayor interacción proteína-proteína y mayor proporción de proteína involucrada en la matriz, como se observó en la Sección anterior. Se puede notar la diferencia entre la matriz de las soluciones entrelazadas, que se asemejan a una red de filamentos proteicos (Figura 6a, d, g, h, j y k) y la matriz compacta de los geles (Figura 6b, c, e, f, i y l).

Así como varió la microestructura de la matriz por el aumento de la concentración, se evaluó la variación de la matriz según el tratamiento aplicado. Al 7,5% se obtuvieron soluciones entrelazadas con todos los tratamientos aplicados. Las microestructuras de las soluciones entrelazadas obtenidas por los TT fueron ordenadas y homogéneas. Se observaron filamentos unidos entre sí formando una red, donde la de 70 °C presentó poros más pequeños y homogéneos que la de 90 °C (Figura 6a y d, respectivamente). Por otro lado, las sometidas a TAPH fueron menos homogéneas, con filamentos combinados con otras estructuras más agregadas, principalmente a 400 MPa (Figura 6g). A 600 MPa se apreciaron estructuras entrelazadas más gruesas a los filamentos de las tratadas térmicamente.

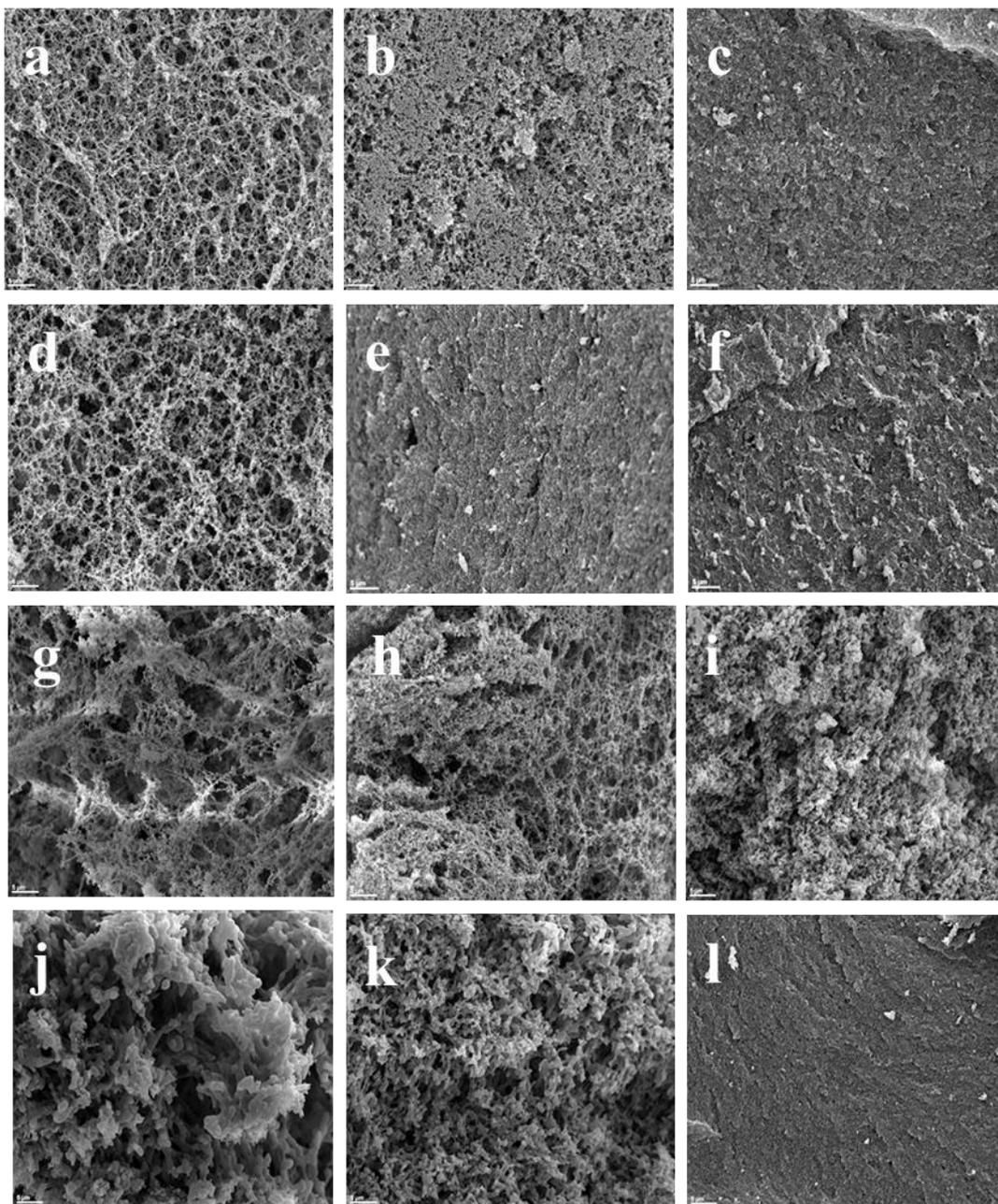


Figura 6: Microscopía electrónica de barrido de dispersiones proteicas de A10 sometidas a TT a 70 °C (a, b y c) o 90 °C (d, e y f) o a TAPH a 400 MPa (g, h e i) o 600 MPa (j, k y l). A diferentes concentraciones: 7,5% (a, d, g y j); 10,5% (b, e, h y k) y 13,5% (c, f, i y l). Aumento 2000x.

Las diferencias entre la red obtenida por TT y TAPH se deberían a las diferencias en la estructura de las proteínas desnaturalizadas por cada tipo de tratamiento, de acuerdo con resultados analizados en el Capítulo I. También concuerda con las diferencias encontradas en los espectros mecánicos y la cantidad de proteínas unidas débilmente a la red, expuestas anteriormente en este Capítulo. Estas diferencias en la red proteica inicial (antes de llegar a la concentración crítica para formar un gel) entre los tratamientos estudiados, podría relacionarse con los resultados antes discutidos que demuestran que con

los TAPH se necesita más proteína para formar una red elástica capaz de auto-portarse (Sección 1.1. de este Capítulo).

Al 10,5% con los TT se obtuvieron geles y con APH nuevamente soluciones entrelazadas (Figura 1). Los geles térmicos mostraron estructuras más compactas y homogéneas principalmente a 90 °C, en esta última se observó la presencia de poros pequeños en toda la matriz (Figura 6b y e, respectivamente). Esto concuerda con menor solubilidad en BS sin y con agentes desnaturizantes, cuando la temperatura fue mayor, lo que correspondería a mayores interacciones a causa de mayor desnaturalización proteica. Las dispersiones entrelazadas obtenidas por TAPH al 10,5%, mostraron una red de poros más pequeños que las dispersiones entrelazadas de menor concentración (Figura 6h y k). La red formada con 400 MPa siguió presentando algunos filamentos combinados con estructuras más gruesas, lo que podría explicar que no se llegó a la estructura de un gel a pesar de la concentración de proteínas. En cambio, la de 600 MPa presentó cierta homogeneidad en la red formada por los filamentos más gruesos que los obtenidos por los TT. En los paneles k y l de la Figura 1 se pueden observar las diferencias en los espectros mecánicos de las muestras tratadas a 400 y 600 MPa, si bien ninguno fue un gel auto-portante, se observó que los módulos G' y G'' de la dispersión tratada a 600 MPa se superponían.

A la mayor concentración estudiada (13,5%) todos los tratamientos provocaron gelificación de A10, la microestructura de los mismos fue compacta y homogénea. A esta concentración aumentó el número de interacciones proteicas y la contribución de enlaces covalentes fue mayor, principalmente en los térmicos. Los obtenidos por APH presentaron predominios de puentes de hidrógeno, pero la microestructura no demostró grandes diferencias con la de los térmicos (Figura 6c, f y l). Solo la microestructura del gel obtenido con 400 MPa, mostró diferencias, al contener poros apreciables y cierto grado de heterogeneidad, concordando con los resultados anteriores demostrando ser un gel más débil que los otros (menor valor de G'). Tal vez la desnaturalización completa a 600 MPa permitió que los polipéptidos se distribuyeran por todo el espacio, mientras que a 400 MPa quedarían porciones de las proteínas sin desplegar, generando un sistema más heterogéneo. Cabe destacar, que a pesar de la menor homogeneidad en las dispersiones con TAPH, la interacción con el agua fue alta (alta WHC), lo que podría deberse al predominio de interacciones puente hidrogeno.

1.6. Textura

El análisis del perfil de textura (TPA) consiste en registrar la respuesta de una muestra a dos compresiones sucesivas, imitando el proceso de masticación (Bourne, 1968). Este análisis se pudo realizar solamente en los geles auto-portantes, por lo tanto con los geles térmicos se evaluó el efecto de la concentración proteica (en el rango 10,5 a 13,5% p/p) a las dos temperaturas (70 y 90 °C) y a la concentración de 13,5% p/p se evaluó el efecto de los tratamientos aplicados (TT o TAPH).

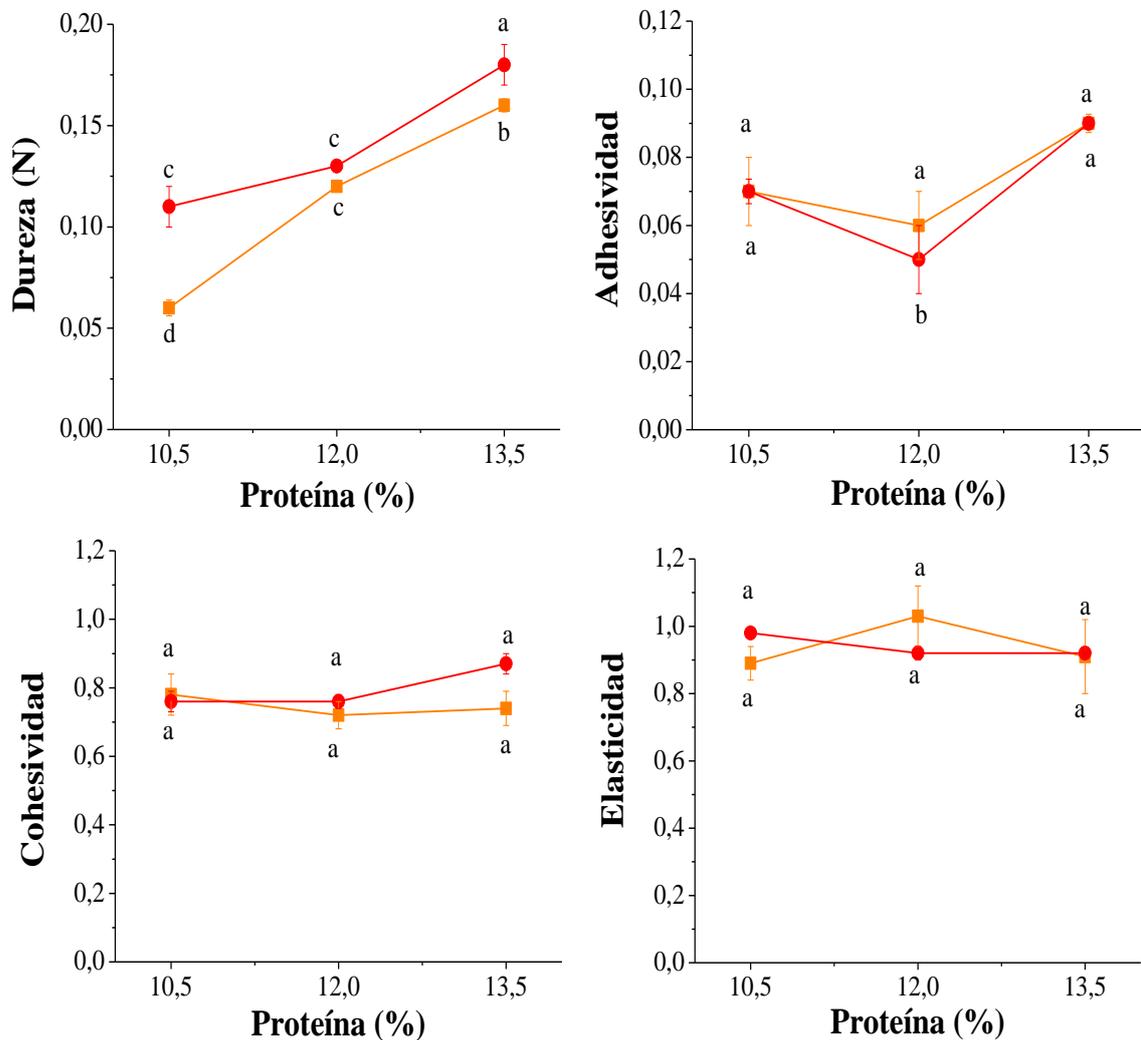


Figura 7: TPA de geles de A10 obtenidos por TT a 70 (■) o 90 °C (●) en función de la concentración proteica. Promedio ± error estándar. Letras distintas en un mismo gráfico indican diferencias significativas (p<0,05).

El incremento de la concentración proteica generó geles térmicos más duros, tanto a 70 como a 90 °C (Figura 7a). El efecto de la concentración proteica se debió al incremento de las interacciones proteína-proteína que existen en los geles más concentrados. Este comportamiento también fue reportado en geles de amaranto y geles de soja (Avanza *et al.*, 2005a y Puppo *et al.*, 1998a). A pesar de las diferencias encontradas en los módulos G' entre los geles obtenidos a 70 o 90 °C (Sección 1.1. de este Capítulo), en el TPA solo se encontraron pequeñas diferencias significativas ($p < 0,05$) en la dureza de los geles obtenidos a diferentes temperaturas (Figura 7a). La adhesividad de los geles térmicos no varió significativamente ($p > 0,05$) con la concentración ni con la temperatura del TT (Figura 7b). Cabe destacar, que al finalizar las determinaciones, muchas veces el gel quedó adherido a la sonda. La alta adhesividad pudo deberse a que el gel es más deformable (menores valores de G' y G'') a baja concentración proteica, mientras que a alta concentración proteica las interacciones entre el gel y la sonda gobernarían la adhesividad. La cohesividad y elasticidad no variaron significativamente con el incremento de la concentración y la temperatura (Figura 7c y d). Este comportamiento pudo deberse a que en todos los casos las fuerzas implicadas en la red fueron suficientes para formar geles auto-portantes

Al comparar los TPA de los geles auto-portantes obtenidos al 13,5% p/p por TT o TAPH, se encontró que la dureza dependió de la intensidad del tratamiento, los geles obtenidos a 600 MPa presentaron dureza semejante a la de los geles térmicos obtenidos a 70 °C, mientras que los obtenidos a 400 MPa presentaron menor dureza ($p < 0,05$) (Figura 8a), esto se relacionaría con el menor valor de G' (Sección 1.1.) y con las diferencias encontradas en la matriz del gel a 400 MPa (Sección 1.4.). Se observó que los TAPH generaron geles de elasticidad silimilar ($p > 0,05$, Figura 8d) pero menor adhesividad y cohesividad que los geles térmicos ($p < 0,05$, Figura 8b y c respectivamente). Las diferencias en la adhesividad y cohesividad entre los geles obtenidos por los diferentes tratamientos estuvo relacionada con las diferentes interacciones entre polipéptidos que predominaron en cada tipo de gel, mayor proporción de puentes disulfuro en los térmicos y mayor proporción de puentes de hidrógeno en los obtenidos por APH (Sección 1.4.).

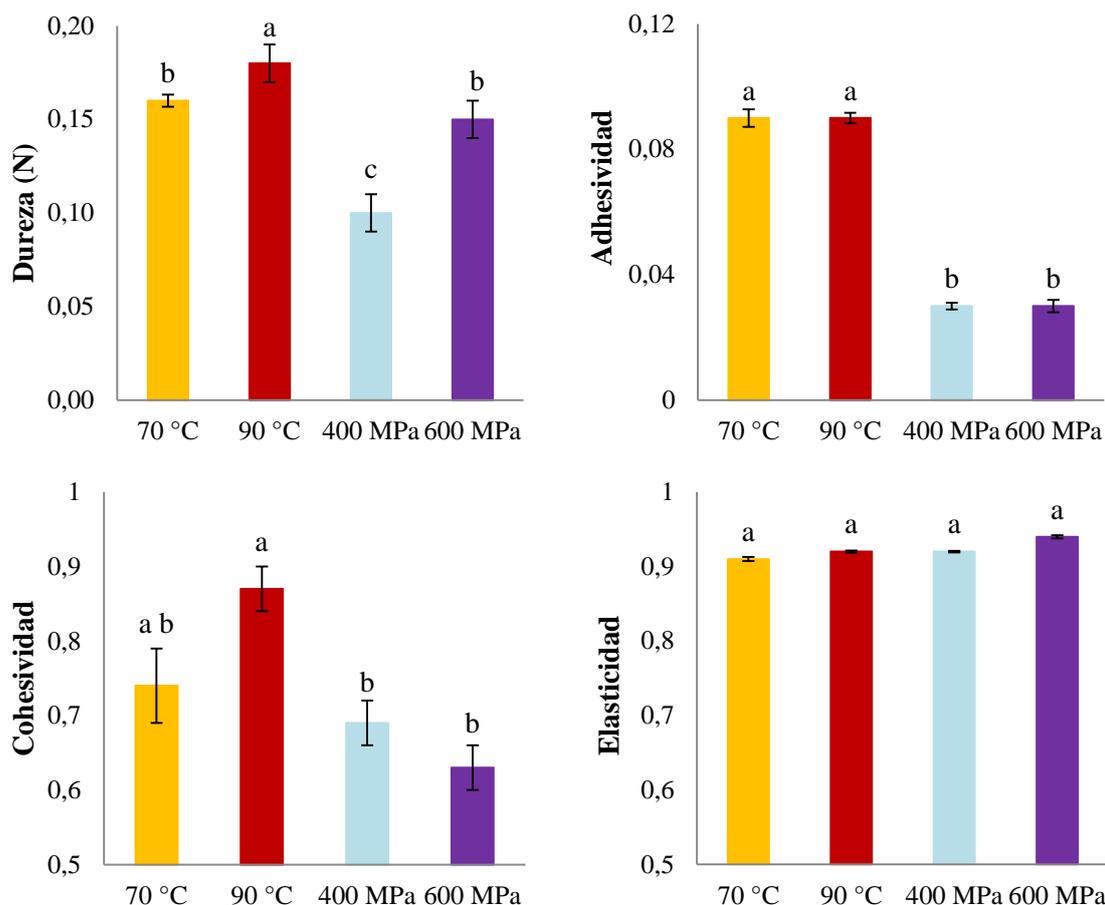


Figura 8: TPA de geles de A10 (al 13,5% p/p) obtenidos por TT a 70 (■) o 90 (■) °C, o por TAPH a 400 (■) o 600 (■) MPa. Promedio \pm error estándar. Letras distintas en un mismo panel indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

1.7. Conclusiones parciales

Se pudo lograr la gelificación de las proteínas de caupí tanto por TT a partir de 9,0 o 10,5% p/p a 90 o 70 °C, respectivamente; y por TAPH a partir de 12,0 o 13,5% p/p a 600 o 400 MPa.

El aumento de la concentración proteica produjo geles térmicos más fuertes con mayor capacidad de retención de agua a causa de la formación de redes proteicas más compactas y homogéneas por aumento de las interacciones proteína-proteína y disminución de la cantidad de proteínas débilmente unidas a la red. Estos cambios aumentaron la dureza de los geles pero no variaron la adhesividad ni la cohesividad de los mismos. En los geles con TAPH el efecto de la concentración proteica no se pudo evaluar ya que el rango de concentraciones empleado generó solo uno o dos geles auto-portantes.

La formación de geles por TAPH requirió mayor concentración proteica, y las características dependieron del nivel de presión. Al evaluar G' en función de la

concentración proteica se encontró que las proteínas de A10 tendrían menor capacidad de interactuar entre sí, necesitando mayor concentración proteica para obtener una matriz más elástica, cuando fueron sometidas a TAPH que cuando fueron sometidas a TT. Diferencias en la red proteica a baja concentración (antes de llegar a la concentración crítica para formar un gel) entre los tratamientos, podrían relacionarse con la necesidad de mayor concentración proteica por parte de los TAPH. La microestructura de las soluciones entrelazadas fue semejante a una red de filamentos finos de proteínas globulares con predominio de interacciones no covalentes, pero las obtenidas por los TT fueron más ordenadas y homogéneas que las obtenidas por TAPH. Las diferencias entre los tipos de tratamientos para lograr la gelificación probablemente se debieron a los diferentes fenómenos de desnaturalización-agregación. En el caso de los TAPH la mayor concentración y proximidad entre las moléculas sería el factor clave para generar una matriz viscoelástica ordenada de gel.

A la concentración en que todos los tratamientos generaron geles auto-portantes (13,5%) se encontró que los obtenidos por TT a 90 °C presentaban mayores valores de G' que los obtenidos con el TAPH a 600 MPa, pero este último presentaba mejor viscoelasticidad (menor valor de $\tan \delta$). Mientras que con los tratamientos de menor nivel (70 °C y 400 MPa) la elasticidad (G') también fue mayor con el TT pero la viscoelasticidad no presentó diferencias significativas. Todos los geles presentaron alta capacidad de retención de agua y en ninguno de ellos se observó sinéresis espontánea, demostrando una excelente interacción entre el agua y la matriz proteica sin diferencias significativas entre los tratamientos empleados. Visualmente, los geles presentaron tonalidades cercanas a un color marrón/ámbar y tuvieron aspectos más translúcidos que opacos, sin indicios de blancura. Las diferencias principales en los geles auto-portantes obtenidos por TT o por TAPH radicaron en matrices proteicas con predominio de diferentes interacciones, los geles obtenidos por APH tendrían más enlaces puente de hidrógeno y menos enlaces disulfuro que los geles térmicos. La microestructura de los geles fue compacta, con poros pequeños, solo la microestructura del gel obtenido con 400 MPa, mostró diferencias, al contener poros apreciables y cierto grado de heterogeneidad (fue además el gel con menor valor de G').

Al nivel de grandes deformaciones (perfil de textura) las diferencias entre los TT y TAPH también dependieron del nivel de presión utilizado. Los geles obtenidos a 600 MPa presentaron dureza semejante a la de los geles térmicos obtenidos a 70 °C, mientras que los obtenidos a 400 MPa fueron menos duros. Las mínimas diferencias en la adhesividad y

cohesividad entre los geles obtenidos por los diferentes tratamientos estarían relacionadas con los balances de las diferentes interacciones proteicas que predominan en cada tipo de gel.

Por lo observado, se presenta el TAPH como un tratamiento alternativo para obtener geles proteicos de caupí sin la necesidad de aplicar altas temperaturas (geles fríos), ventaja que se puede utilizar para la obtención de matrices proteicas capaces de contener sustancias lábiles al calor.

2. Geles obtenidos a partir de A10 sometido a TT o a TAPH. Efecto de la incorporación de calcio

En esta Sección caracterizamos geles obtenidos por TT o por TAPH a partir de dispersiones de A10 al 7,5% p/p de proteína a las cuales se incorporó CaCl_2 en diferentes concentraciones entre 0 y 40 mM. Realizamos también un estudio de las propiedades térmicas de dichas dispersiones a fin de relacionar el grado de desnaturalización (GD) alcanzado con cada tratamiento con las características de los geles.

Tabla 3: Efecto de la incorporación de calcio en propiedades térmicas de proteínas de A10.

CaCl ₂ (mM)	Td	Tonset	Toffset
0	77,85 ± 0,15f	70,04 ± 0,30f	82,12 ± 0,28f
10	80,29 ± 0,05e	72,99 ± 0,47e	84,65 ± 0,20e
15	81,70 ± 0,02d	74,47 ± 0,50d	87,10 ± 0,06d
20	84,85 ± 0,20c	77,47 ± 0,34c	91,48 ± 0,47c
30	88,38 ± 0,07b	81,72 ± 0,99b	94,23 ± 0,23b
40	89,45 ± 0,06a	83,20 ± 0,25a	94,99 ± 0,12a

Dispersiones proteicas de A10 (7,5% p/p). Promedio ± error estándar. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Como se mencionó en el Capítulo II, la incorporación de calcio aumentó la estabilidad térmica de las proteínas de caupí. Cada incremento en la concentración de calcio incorporada aumentó significativamente ($p < 0,05$) la estabilidad térmica de las

proteínas de A10, la endoterma se fue desplazando progresivamente hacia la izquierda, aumentando la *Tonset*, la *Td* y la *Toffset* (Tabla 3 y Figura 9). En las concentraciones más altas de calcio (20, 30 y 40 mM), el corrimiento del pico principal hacia temperaturas más altas permitió observar un pequeño pico a $68,0 \pm 0,5$ °C (flecha roja, Figura 9b), que correspondería a una fracción proteica cuya *Td* fue insensible al calcio. El calcio interactúa con sitios con carga negativa y con sitios específicos de las proteínas, estas interacciones influyen en la conformación y pueden inducir a la agregación por medio de puentes de calcio. Los aumentos en *Td* también pudieron deberse al favorecimiento de las interacciones hidrofóbicas por el aumento de la fuerza iónica (Myers, 1990).

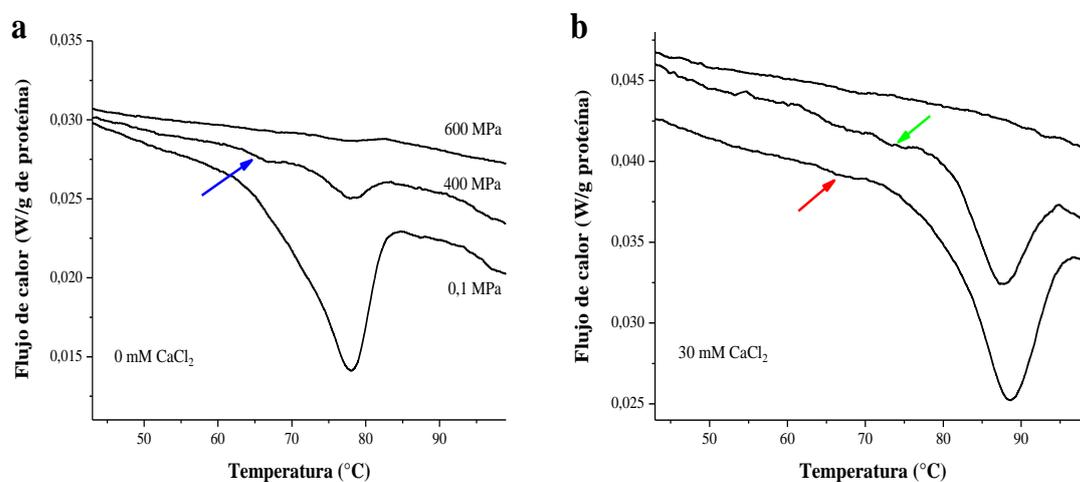


Figura 9: Termogramas de A10 (7,5% p/p) **a)** sin incorporación de calcio y **b)** con incorporación de 30 mM de CaCl₂. De abajo hacia arriba las curvas corresponden a dispersiones sin TAPH (0,1 MPa) y con TAPH (400 o 600 MPa). Las flechas indican picos que fueron detectados por la incorporación de calcio o el TAPH.

Dado que las temperaturas de los TT aplicados durante 20 min fueron en un caso menor y en otro mayor a las *Td*, consideramos que para el TT a 70 °C se alcanzó un bajo GD, mientras que para el TT a 90 °C la desnaturalización fue completa. Cabe destacar que la *Td* en las muestras sin incorporación de calcio fue inferior a la informada en el Capítulo II ($79,69 \pm 0,07$ °C) esta diferencia se debería a la diferencia en la concentración proteica (10,5 vs. 7,5%). Como se mencionó en la Sección 1.1.3. del Capítulo II, las propiedades térmicas de las proteínas de caupí fueron sensibles a la concentración proteica debido a que su desnaturalización podría implicar un primer paso de disociación de agregados.

La incorporación de calcio aumentó significativamente el ΔH ($p < 0,05$) de las dispersiones proteicas de A10 sin tratamiento como también se observó en la Sección 3.1.3. del Capítulo II; en este caso el aumento fue detectado desde 10 mM y su magnitud

fue independiente de la concentración de calcio, en el rango ensayado (Tabla 4, dispersiones sin presurizar (0,1 MPa)). Speroni *et al.* (2010a) informaron para proteínas de soja que la presencia de calcio indujo el aumento en el ΔH de β -conglucina con 25 mM pero no con 12 mM, mientras que para glicina el aumento se observó en ambas concentraciones de calcio. Es posible entonces que las globulinas nativas del tipo vicilina (como β -conglucina y la mayoría de las de A10) sean menos sensibles al calcio. Por otro lado, Hendrix *et al.*, (2000) propusieron que el calcio permitiría la asociación de sitios con carga negativa de α -lactalbumina, evitando así desplegamiento. Estos datos sugieren que los efectos del calcio sobre la estabilidad de las proteínas dependen del tipo de proteína. En las proteínas de A10 el calcio podría reforzar interacciones existentes y/o promover el establecimiento de nuevas interacciones cuya ruptura fuera endotérmica, como puentes de calcio y/o enlaces de hidrógeno.

Tabla 4: Entalpía de transición (ΔH) y grado de desnaturalización (GD) de A10 a diferentes concentraciones de calcio incorporadas y sometidas a TAPH (400 o 600 MPa) o no presurizadas (0,1 MPa).

CaCl ₂ (mM)	0,1 MPa		400 MPa		600 MPa	
	ΔH	GD%	ΔH	GD%	ΔH	GD%
0	5,59 ± 0,07b	0	0,77 ± 0,08f	86,2	0,19 ± 0,05g	96,5
10	6,18 ± 0,11a	0	1,08 ± 0,06f	82,5	0,08 ± 0,03g	98,7
20	6,08 ± 0,06a	0	1,58 ± 0,06e	73,9	0,09 ± 0,03g	98,5
30	6,34 ± 0,01a	0	2,86 ± 0,19d	54,9	0,18 ± 0,07g	97,2
40	6,15 ± 0,02a	0	4,34 ± 0,20c	29,5	0,15 ± 0,06g	98,2

Dispersiones proteicas de A10 (7,5% p/p). Promedio ± error estándar. Los valores de ΔH se expresaron en J/g de proteína. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

El GD de las proteínas de A10 sin incorporación de calcio fue del 86,2% después del tratamiento con 400 MPa y 96,5% después del tratamiento con 600 MPa (Tabla 4). En el Capítulo I los TAPH se habían llevado a cabo en dispersiones diluidas de A10 (1% p/p de proteína) obteniéndose GD más bajos (58,8 y 64,4% para 400 y 600 MPa respectivamente), mientras que en el presente Capítulo y en la Sección 2.1.2. del Capítulo

II las dispersiones fueron más concentradas (7,5 y 10,5% de proteína, respectivamente). Las diferencias en los GD pudieron deberse a diferencias en los mecanismos de disociación-desnaturalización-agregación que se produjeron en cada concentración proteica. En los TAPH la desnaturalización de las proteínas ocurriría principalmente en la etapa de compresión y la agregación en la etapa de descompresión, es posible que a baja concentración proteica no se favoreciera la agregación entre proteínas después de la desnaturalización y se produjera una reversión a un estado más parecido al nativo (Sección 2.2.2. del Capítulo I). No se detectaron cambios significativos en la Td después de los tratamientos con 400 o 600 MPa. Este comportamiento también se describió para β -conglucina (soja) y faseolina (frijol), hecho que fue explicado por una estructura proteica compacta en esas globulinas (Molina *et al.*, 2001 y Yin *et al.*, 2008). En los termogramas de las muestras sometidas a TAPH la desnaturalización de las proteínas correspondientes al pico principal permitió evidenciar un pequeño pico a $66,84 \pm 0,52$ °C (flecha azul, Figura 9a), que correspondería a una fracción de proteínas relativamente menos sensibles a las APH que las mayoritarias que originaron el pico principal. El ΔH medido después del tratamiento con 600 MPa ($0,19 \pm 0,05$ J / g de proteína, Tabla 4) correspondió al pico a $66,84$ °C más el residuo del pico principal a $77,44$ °C.

El GD después del tratamiento con 400 MPa fue función de la concentración de calcio incorporada. El GD más bajo se detectó con 40 mM (Tabla 4). Este hecho indica que el calcio protegería a las proteínas de caupí de la desnaturalización inducida por APH a este nivel de presión. A las concentraciones más altas de calcio (30 y 40 mM) y con el tratamiento a 400 MPa, la desnaturalización parcial de la fracción proteica principal permitió observar otro pico pequeño con Td a $73,24 \pm 0,07$ y $75,85 \pm 0,10$ °C a 30 y 40 mM CaCl_2 , respectivamente (flecha verde Figura 9). Después del tratamiento con 600 MPa, el pico principal de la endoterma desapareció en presencia de calcio, y solo una pequeña transición a *ca.* 67 °C fue detectada, el GD estuvo entre 97,2 y 98,7% (Figura 9 y Tabla 4). El efecto baroprotector del calcio dependió del nivel de presión, ya que se verificó solamente a 400 MPa. En β -conglucina de soja se describió también un efecto baroprotector del calcio a 200 MPa, que no se detectó a 400 MPa, mientras que el efecto fue de sensibilización a 600 MPa. En el caso del NaCl el efecto baroprotector sobre β -conglucina se verificó a 200 y 400 MPa pero no a 600 MPa. Por su parte, en glicina de soja se detectó baroprotección en cada nivel de presión ensayado y tanto para CaCl_2 como para NaCl (Speroni *et al.*, 2010a y Añón *et al.*, 2011). Estos efectos de las sales sobre el

GD refuerzan la hipótesis de que las vicilinas y leguminas se comportan de diferente forma frente a las APH.

Estos datos sugieren que la presencia de calcio podría afectar las características de los geles, por un lado, por la posibilidad de generar nuevas interacciones entre los polipéptidos y, por otro lado, por disminuir en ciertos casos el GD.

2.1. Comportamiento reológico

Con la incorporación de calcio se obtuvieron geles a 7,5% p/p de proteína, concentración menor a la concentración crítica (CC) determinada en la Sección 1.1. de este Capítulo. Este resultado concuerda con los obtenidos en la Sección 3.1.1. del Capítulo II, donde la CC en presencia de calcio era un nivel inferior a la correspondiente a las muestras sin calcio. La presencia de calcio favoreció el establecimiento de nuevas atracciones entre polipéptidos (por ejemplo entre dos restos cargados negativamente que se hubieran repelido en ausencia de calcio) permitiendo establecer una matriz con menos cantidad de proteína. A todas las concentraciones de calcio incorporada y con los diferentes tratamientos empleados se obtuvieron espectros mecánicos típicos de geles, excepto para las muestras con 10 mM de calcio tratadas a 400 MPa en que se obtuvo un espectro de solución entrelazada (G' menor a G'' , gran dependencia con la frecuencia de ambos módulos y sin punto de cruce; Figura 10a). En la Figura 10 se muestran como ejemplos los espectros mecánicos solo de las muestras sometidas a TAPH a 400 MPa y en la Tabla 5 se muestran los parámetros del ajuste al modelo potencial ($G' = G'^* \cdot f^n$ y $G'' = G''* \cdot f^m$), donde los exponente n y m reflejan la dependencia de los módulos G' y G'' , respectivamente, con la frecuencia, de todas las muestras estudiadas.

Los menores valores de n se encontraron con 10 mM de calcio cuando se aplicaron los tratamientos de mayor nivel (90 °C y 600 MPa), tomando valores de 0,10 - 0,11 semejante a los geles fuertes sin calcio de 13,5% p/p (Tabla 2, de la Sección 1.1. y Tabla 5 de esta Sección). Con estos tratamientos donde se alcanzó la desnaturalización completa de las proteínas, se obtuvieron espectros mecánicos típicos de geles fuertes semejantes al de la Figura 10c, a pesar de que el aumento de la concentración de calcio incorporada produjo un aumento significativo del exponente n (Tabla 5). Para el TT a 70 °C los exponentes no variaron con el aumento de la incorporación de calcio, excepto a la mayor concentración donde se obtuvo un gel débil (espectro mecánico semejante al de la Figura 10b) con mayor dependencia de G' con la frecuencia ($n = 0,34 \pm 0,10$, Tabla 5). En el TAPH a 400 MPa, la

relación con la concentración de calcio fue inversa, a la menor concentración a la cual se obtuvo gel (15 mM) este presentaba la mayor dependencia de G' con la frecuencia ($n = 0,80 \pm 0,27$ Tabla 5) característico de un gel débil (Figura 10b). Al igual que los geles sin calcio, la dependencia del módulo G'' con la frecuencia (exponente m) siempre fue menor a la del módulo G' (exponente n).

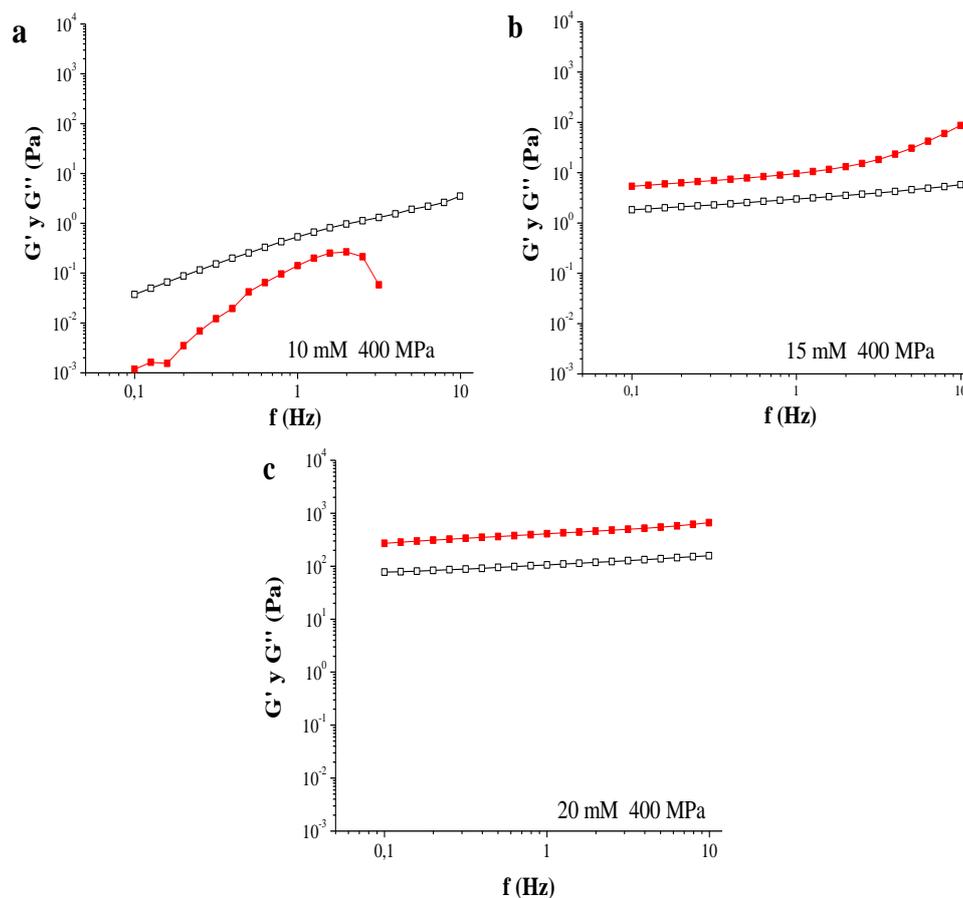


Figura 10: Espectros mecánicos de dispersiones de A10 al 7,5% con incorporación de calcio sometidas a TAPH a 400 MPa (a) 10 (b) 15 (c) 20 mM de CaCl_2 . G' (■) G'' (□).

En la Figura 11 se observan las fotografías de los geles con calcio y sus respectivos valores de $\tan \delta$ a 1 Hz (viscoelasticidad) y en la Figura 12 los valores de G' a 1 Hz en función de la concentración de calcio incorporada. Si bien la mayoría de los geles fueron auto-portantes tuvieron la característica de presentar sinéresis espontánea principalmente a las mayores concentraciones de calcio incorporadas. El efecto de la concentración de calcio incorporada en el comportamiento reológico de los geles varió según el tratamiento aplicado.

Tabla 5: Ajuste al modelo potencial de los módulos G' y G'' en función de la frecuencia (f) ($G' = G'^* f^n$ y $G'' = G''^* f^m$) con diferentes concentraciones de calcio adicionado.

	CaCl ₂ (mM)	G'^*	n	R^2	G''^*	m	R^2
70 °C	0	0,42 ± 0,00h	1,60 ± 0,31b	0,9558	0,35 ± 0,01g	1,41 ± 0,06ab	0,9020
	10	237 ± 9h	0,18 ± 0,01d	0,9814	60 ± 3fg	0,10 ± 0,00f	0,8468
	15	466 ± 23gh	0,20 ± 0,02d	0,9916	134 ± 23fg	0,14 ± 0,02e	0,9742
	20	369 ± 33h	0,20 ± 0,03d	0,9908	108 ± 22fg	0,14 ± 0,03e	0,9627
	30	190 ± 6h	0,20 ± 0,00d	0,9873	55 ± 2fg	0,11 ± 0,00f	0,9157
	40	65 ± 6h	0,34 ± 0,10c	0,9747	24 ± 2fg	0,14 ± 0,01e	0,9624
90 °C	0	0,47 ± 0,09h	2,00 ± 0,28ab	0,9592	0,85 ± 0,18g	1,46 ± 0,57ab	0,8295
	10	1379 ± 115gh	0,11 ± 0,00f	0,9998	287 ± 27fg	0,52 ± 0,43de	0,9902
	15	3904 ± 189def	0,15 ± 0,00e	0,9992	950 ± 36de	0,14 ± 0,00e	0,9996
	20	4000 ± 23def	0,14 ± 0,00e	0,9909	980 ± 49de	0,13 ± 0,00e	0,9825
	30	5297 ± 145de	0,17 ± 0,00d	0,9852	1271 ± 51d	0,11 ± 0,00f	0,9990
	40	4865 ± 858d	0,17 ± 0,00d	0,9991	1276 ± 27d	0,13 ± 0,00e	0,9758
400 MPa	0	0,27 ± 0,15h	2,25 ± 0,34a	0,9801	0,27 ± 0,09g	1,56 ± 0,21a	0,8627
	10	0,07 ± 0,01h	1,65 ± 0,20b	0,7855	0,44 ± 0,01g	0,96 ± 0,01cd	0,9888
	15	9,01 ± 3,68h	0,80 ± 0,27c	0,9134	2,64 ± 0,43g	0,27 ± 0,03cd	0,9933
	20	412 ± 30gh	0,18 ± 0,00d	0,9957	107 ± 7fg	0,16 ± 0,00e	0,9958
	30	1771 ± 75fgh	0,17 ± 0,00d	0,9995	505 ± 27efg	0,17 ± 0,00e	0,9969
	40	1737 ± 64fgh	0,17 ± 0,00d	0,9997	527 ± 15efg	0,16 ± 0,00e	0,9997
600 MPa	0	0,09 ± 0,01h	1,80 ± 0,24b	0,8059	0,40 ± 0,01g	1,04 ± 0,01bc	0,9726
	10	173 ± 10h	0,10 ± 0,00f	0,9995	29 ± 2fg	0,11 ± 0,01f	0,9010
	15	2705 ± 101efg	0,14 ± 0,00e	0,9975	601 ± 19ef	0,10 ± 0,00f	0,9243
	20	8430 ± 381c	0,15 ± 0,00e	0,9988	2071 ± 88c	0,14 ± 0,00e	0,9947
	30	15298 ± 495b	0,14 ± 0,00e	0,9993	3684 ± 139b	0,14 ± 0,00e	0,9824
	40	19845 ± 700a	0,14 ± 0,01e	0,9990	4718 ± 985a	0,14 ± 0,00e	0,9868

Dispersiones proteicas de A10 (7,5% p/p) con adición de calcio (de 0 a 40 mM) sometidas a TT (70 o 90 °C) o a TAPH (400 o 600 MPa). Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Con el TT a 70 °C el aumento de la concentración de calcio incorporada provocó geles menos elásticos, más viscosos, con aumento de la $\tan \delta$ y se observó aumento de la sinéresis espontánea, incluso con 40 mM el gel no se auto-portaba (Figura 11). Con este tratamiento se obtuvieron los geles de menor elasticidad comparado con los otros tratamientos (valores de G' entre 237 y 466 Pa), el mayor valor de G' correspondió a 15 mM de CaCl_2 (Tabla 5 y Figura 12). Este comportamiento se debería al aumento de la estabilidad térmica de las proteínas de A10 por la presencia de calcio. Con las mayores concentraciones de calcio (30 y 40 mM) el inicio de la desnaturalización se dio a temperaturas *ca.* 80 °C (Tabla 3), por lo que es probable que con el TT a 70 °C no se alcanzaran a desnaturalizar las proteínas. En la Sección 3.1.2. del Capítulo II se encontró que con el ciclo térmico con *plateau* a 70 °C no se llegaba a $\tan \delta$ menores a 0,3 por lo que las interacciones que estabilizaron la matriz proteica en esta Sección habrían ocurrido durante las 12 h de almacenamiento en frío (4 °C) que transcurrieron antes de su análisis. Con el TT a 90 °C se obtuvieron geles auto-portantes con $\tan \delta$ entre $0,21 \pm 0,00$ y $0,25 \pm 0,01$ sin diferencias significativas ($p > 0,05$, Figura 11) al aumentar la concentración de calcio incorporada. El módulo G' aumentó significativamente solo al aumentar la concentración de calcio de 10 a 15 mM, luego permaneció sin cambios significativos ($p > 0,05$) con valores *ca.* 5000 Pa (Tabla 5 y Figura 12). En este caso las proteínas de A10 lograron desnaturalizarse ya que a los 90 °C fueron superadas las T_d a todas las concentraciones de calcio ensayadas (Tabla 3). Por lo que a diferencia del TT a 70 °C en este caso se pudieron favorecer interacciones como las hidrofóbicas que aumentaron por la desnaturalización proteica. Estos resultados concuerdan con la idea expuesta en el Capítulo II de que la presencia de calcio favorecería el establecimiento de interacciones entre proteínas con bajo grado de desnaturalización, pero para alcanzar cierto grado de viscoelasticidad (bajos valores de $\tan \delta$ por mayor componente elástico) se necesitaría mayor grado de desnaturalización para estabilizar la red con otras interacciones (por ejemplo del tipo hidrofóbico).

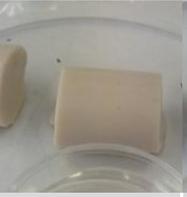
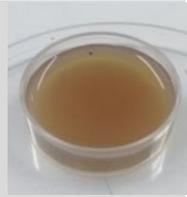
	0 mM	10 mM	15 mM	20 mM	30 mM	40 mM
70 °C						
tan δ	0,72 ± 0,00a	0,24 ± 0,00hi	0,28 ± 0,04def	0,28 ± 0,04def	0,28 ± 0,00def	0,38 ± 0,02b
90 °C						
tan δ	1,35 ± 0,02a	0,21 ± 0,00i	0,24 ± 0,00efg	0,25 ± 0,01efg	0,24 ± 0,00ghi	0,22 ± 0,00hi
400 MPa						
tan δ	1,57 ± 0,85a	3,82 ± 0,50a	0,32 ± 0,01c	0,26 ± 0,00ghi	0,28 ± 0,00cde	0,30 ± 0,00cd
600 MPa						
tan δ	2,33 ± 0,06a	0,16 ± 0,00j	0,21 ± 0,00i	0,24 ± 0,00hi	0,23 ± 0,00hi	0,23 ± 0,00hi

Figura 11: Fotografías de geles de A10 con adición de calcio a diferentes concentraciones (7,5% p/p de proteína, de 0 a 40 mM CaCl₂) obtenidos por TT (70 o 90 °C) o por TAPH (400 o 600 MPa). Debajo de cada fotografía se informa el valor de la viscoelasticidad (tan δ a 1 Hz). Promedio ± error estándar.

Por otro lado, en los geles obtenidos con TAPH, el aumento de la concentración de calcio incorporada aumentó significativamente la elasticidad de los mismos (Tabla 5 y Figura 12). En el caso del TAPH a 400 MPa los mayores valores de G' fueron a 30 y 40 mM de CaCl_2 , pero con $\tan \delta$ mayores que con 20 mM de CaCl_2 . Considerando el efecto baroprotector que se encontró al analizar las propiedades térmicas de las proteínas presurizadas con calcio (Tabla 4), se puede concluir que las interacciones que estabilizaron los geles obtenidos a 400 MPa requirieron bajos grados de desnaturalización. Sin embargo, a diferencia de lo detectado con el TT a 70 °C (condición en que también se llegó a bajos grados de desnaturalización), para 400 MPa se encontró que a mayor concentración de calcio incorporada mayor elasticidad del gel obtenido. Este comportamiento indica diferencias en los mecanismos de gelificación en presencia de calcio por TAPH o por TT. El TAPH a 600 MPa generó los geles de mayor G' en comparación a los otros tratamientos y cada incremento de concentración de calcio duplicó o triplicó el valor de G' (Tabla 5 y Figura 12). Con respecto a la $\tan \delta$ no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) al aumentar la concentración de calcio incorporada y cabe destacar la importante sinéresis observada en los geles con mayor cantidad de calcio (Figura 11).

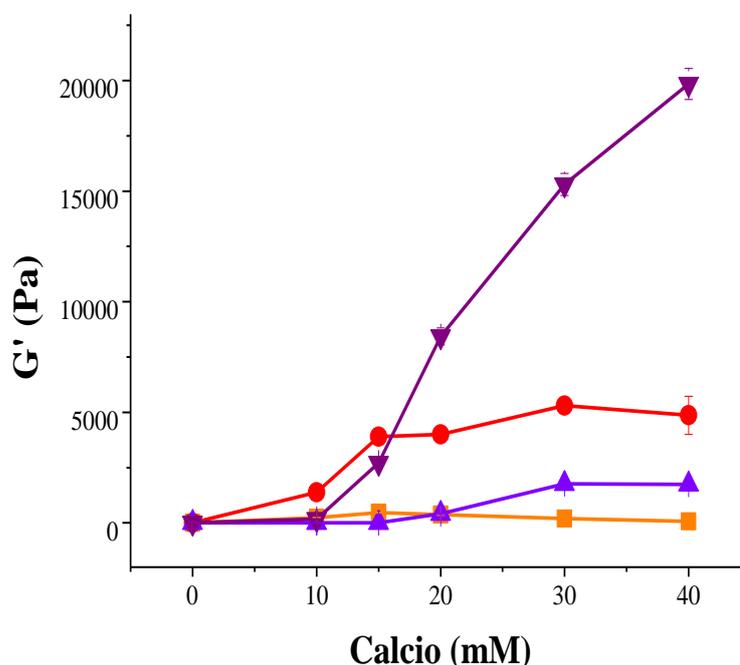


Figura 12: Módulo elástico (G' a 1 Hz) en función de la concentración de calcio incorporada de geles de A10 (7,5% de proteína), obtenidos TT (70 °C (■) o 90 °C (●)) o a TAPH (400 (▲) o 600 MPa (▼)). Promedio \pm error estándar.

Maltais *et al.* (2005) obtuvieron geles fríos por la incorporación de calcio a dispersiones de aislados proteicos de soja con proteicas pre-desnaturalizadas con calor, el rango de concentración utilizado fue entre 6,0 y 9,0% p/p de proteína y de 10 a 20 mM de CaCl₂, e informaron que el aumento de la concentración de calcio aumentó el componente elástico de los geles. Speroni y Añón (2013) trabajaron con geles fríos de proteínas de soja obtenidos por la incorporación de calcio a dispersiones proteicas pre-desnaturalizadas con APH (con concentraciones de proteínas y de calcio de 8,5 y 9,0% p/p y 10 y 15 mM, respectivamente) y determinaron que las propiedades reológicas del gel dependían del nivel de presión utilizado. En nuestro trabajo se obtuvieron geles fríos de proteínas de caupí en concentraciones semejante a las de soja (7,5% p/p), con posibilidad de incorporar un mayor rango de concentraciones de calcio (de 10 a 40 mM) cuando se aplicaron APH luego de la incorporación del mismo.

2.2. Capacidad de retención de agua

Los geles con calcio presentaron sinéresis espontánea principalmente cuando se incorporaron concentraciones iguales o mayores a 20 mM (fotografías de la Figura 11). En este caso la determinación de WHC se realizó en tubos cónicos de 50 mL para recoger el líquido exudado espontáneamente y se aplicó una menor aceleración (120 xg) que en la Sección 1.2. de este Capítulo (en que se había aplicado 10000 xg) ya que la estructura de los geles se destruía con la mayor aceleración y al invertir los tubos *eppendorf* las dispersiones fluían. La necesidad de cambiar la metodología para determinar la WHC fue *per se* un indicador de diferencias en la interacción de la red proteica con el agua. El calcio interacciona con las proteínas a través de los restos de aminoácidos con carga negativa favoreciendo interacciones atractivas en vez de repulsivas entre las proteínas, además de desplazar protones y disminuir el pH de la dispersión como se discutió en la Sección 3.1.1. del Capítulo II. Por estos mecanismos se produciría un desbalance hacia más interacciones proteína-proteína a costa de interacciones proteína-agua (Bryant y McClements, 1998).

Los geles térmicos a bajas concentraciones de calcio (10 y 15 mM) presentaron una WHC dependiente de la temperatura de TT, a 90 °C *ca.* al 80% y a 70 °C entre 54 y 73% ($p < 0,05$, Figura 13). Los valores de WHC disminuyeron hasta *ca.* 20% a las mayores concentraciones (30 y 40 mM) sin diferencias significativas entre las temperaturas empleadas ($p > 0,05$, Figura 13). En los geles obtenidos por APH el efecto del desplazamiento de las interacciones proteína-agua a causa de la presencia de calcio fue más

evidente y la WHC tuvo valores bajos ya desde la incorporación de 15 mM de calcio. A partir de esta concentración de CaCl_2 , no hubieron diferencias significativas con las mayores concentraciones y la WHC fue semejante a la de los geles térmicos con altas concentraciones de calcio ($p > 0,05$, Figura 13).

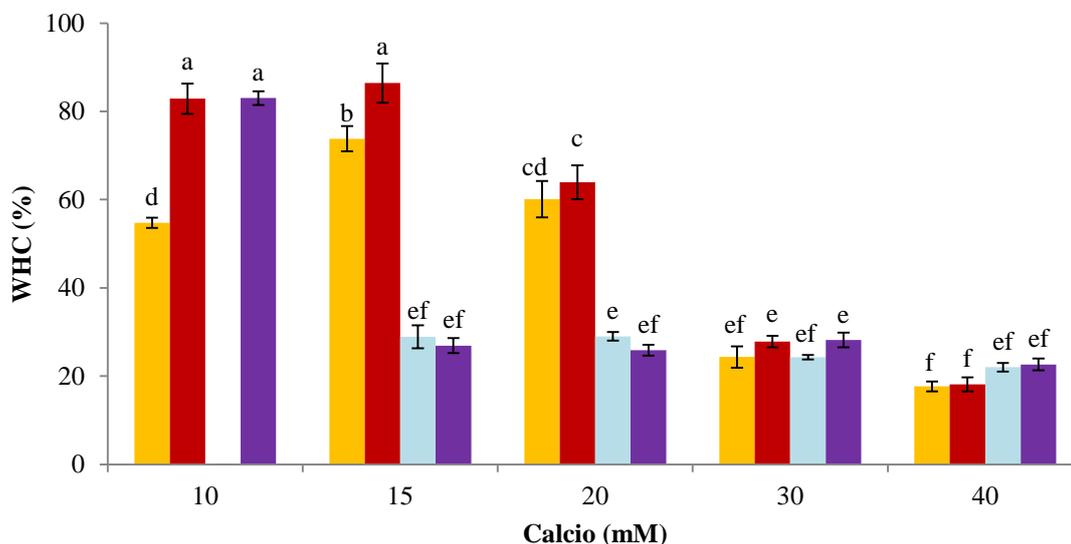


Figura 13: WHC en función de la concentración de calcio incorporada de geles de A10 (7,5% de proteína), obtenidos por TT a 70 (■) o 90 (■) °C, o por TAPH a 400 (■) o 600 (■) MPa. Promedio \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cabe destacar que el líquido perdido luego de la determinación presentaba una leve turbidez, lo que indica no solo pérdida agua sino también parte de la matriz proteica o proteínas que no formaban la red.

Bajas WHC y sinéresis espontánea a causa de la presencia de calcio también fueron reportadas en geles fríos de aislados proteicos de soja (Maltais *et al.*, 2005 y Speroni y Añón, 2013) y corresponde a una característica de los geles del tipo particulados o agregados (Hermansson y Langton, 1994 y Bryant y McClements, 1998).

2.3. Propiedades de color

La incorporación de calcio afectó el color de los geles. Los parámetros a^* , b^* y C^* variaron con la incorporación de calcio según el tratamiento aplicado. Para todos los tratamientos a partir de los 20 mM de calcio incorporado los cambios ya no fueron significativos ($p < 0,05$), y para la mayor concentración (40 mM), los geles presentaron

valores de a^* entre $5,76 \pm 0,11$ a $6,61 \pm 0,06$, b^* entre $0,05 \pm 0,41$ a $1,95 \pm 0,90$ y C^* entre $5,80 \pm 0,15$ a $6,74 \pm 0,72$ (Figura 14).

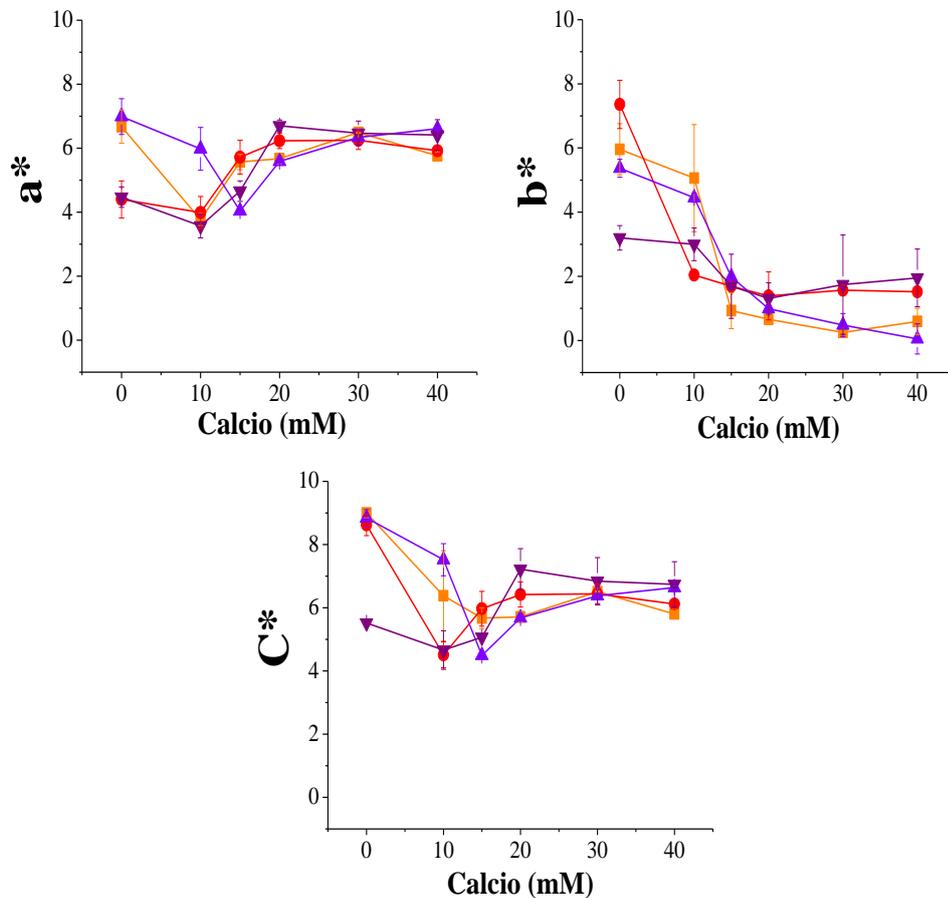


Figura 14: Parámetros de color CIELab (a^* , b^* y C^*) en función de la concentración de calcio incorporada a dispersiones de A10 sometidas a TT (70 (■) o 90 °C (●)) o a TAPH (400 (▲) o 600 MPa (▼)). Promedio \pm error estándar.

El parámetro H^* , representa la tonalidad de los geles, varió según la concentración de calcio incorporada ($p < 0,05$), sin ser significativo el efecto de los tratamientos desnaturalizantes aplicados ($p > 0,05$). En la Tabla 6 se presenta el promedio de los H^* de los geles con los diferentes tratamientos, según la concentración de calcio incorporada. H^* disminuyó al aumentar la concentración y a partir de 20 mM, ya no presentó diferencias significativas. A simple vista, las dispersiones sin calcio se percibían de tonalidades marrón/ámbar variando a tonalidades cada vez más blancas por la incorporación de calcio (Fotografías de la Figura 11), coincidiendo con que H^* tomara valores más pequeños *ca.* 9° (Tabla 6).

Tabla 6: Parámetro H* en función de la concentración de calcio incorporada a geles de A10

Calcio (mM)	H* (°)
0	43,47 ± 10,59a
10	38,79 ± 9,98a
15	17,85 ± 7,08b
20	11,71 ± 4,80bc
30	8,54 ± 6,24c
40	9,18 ± 7,45c

Promedio de geles obtenidos por diferentes tratamientos (70 °C, 90 °C, 400 MPa y 600 MPa) ± error estándar. Parámetro calculado a partir de a* y b* presentados en la Figura 14. Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

El parámetro L*, incrementó a medida que aumentó la concentración de calcio incorporada (p<0,05), coincidiendo con el cambio de color a tonalidades cada vez más blancas. El aumento de L* se relaciona con geles opacos, a causa de interacciones dependientes de calcio que forma geles agregados (Remondetto *et al.*, 2002 y Maltais *et al.*, 2005). A las concentraciones más bajas de calcio incorporadas se observaron diferencias entre los tratamientos aplicados (p<0,05), pero a concentraciones más altas (mayores a 20 mM) no se observó diferencia significativa (p>0,05) entre las concentraciones incorporadas ni entre los distintos tratamientos, llegando a valores entre 72,83 ± 0,53 y 75,69 ± 0,27 (Figura 15).

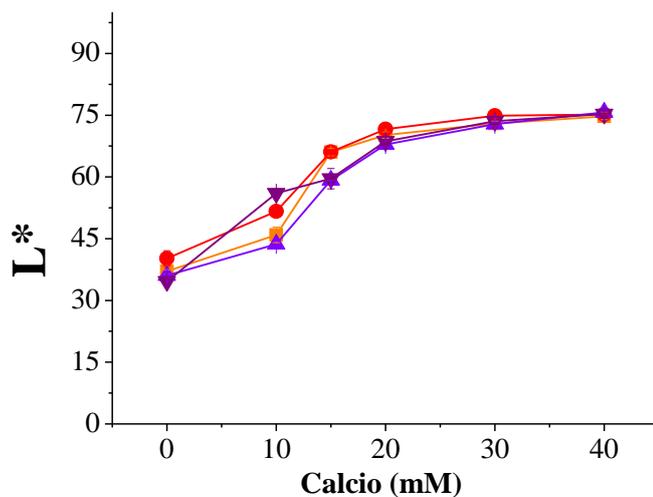


Figura 15: Parámetro de color L* (CIELab) en función de la concentración de calcio incorporada a dispersiones de A10 sometidas a TT (70 (■) o 90 °C (●)) o a TAPH (400 (▲) o 600 MPa (▼)). Promedio ± error estándar.

2.4. Naturaleza de las interacciones proteicas de la matriz

Para estudiar la naturaleza de las interacciones involucradas en la estabilización de la matriz proteica de los geles con incorporación de calcio se analizó la solubilidad en *buffer* salino (BS) con agentes desnaturalizantes como SDS y/o urea, trabajando solo con dos concentraciones de calcio incorporada, 15 y 30 mM. Con estas concentraciones se obtuvieron geles con todos los tratamientos y presentaron diferencias significativas en el comportamiento reológico (principalmente G'), WHC (en los geles térmicos) y color (principalmente en L^*), al evaluar el efecto de la concentración de calcio incorporada, por lo que resultaron representativos de bajas o altas concentraciones de calcio incorporada.

En los geles con 15 mM de calcio incorporado se encontró que la solubilidad de las proteínas en BS dependió del tipo de tratamiento y del nivel de temperatura o presión aplicado. Los geles obtenidos por TT serían los de menor cantidad de proteínas unidas débilmente a la red (baja solubilidad en BS, 18% para el de 90 °C y 35% para el de 70 °C) y los obtenidos por APH mayor cantidad, principalmente luego del tratamiento a 400 MPa (Figura 16a). En los geles con calcio predominarían las interacciones no covalentes, principalmente la iónicas dependientes de calcio, por eso la alta solubilidad con el agregado de los diferentes agentes desnaturalizantes. La solubilidad de las proteínas cuando se agregaron los dos agentes desnaturalizantes estuvo entre 91 y 96% a esta concentración de calcio incorporada, sin diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$, Figura 16a) indicando predominio de interacciones no covalentes y una pequeña proporción de proteínas unidas por interacciones puentes disulfuro. Al comparar los valores de solubilidad de estos geles (7,5% de proteína y 15 mM de CaCl_2) con los de la Figura 5a (7,5% de proteína sin calcio adicionado) se encontró que la presencia de calcio disminuyó la solubilidad en BS, lo que sugiere que una menor cantidad de proteína no asociada a la matriz. Este comportamiento reflejaría que el hecho de que calcio permitió sumar enlaces a los que ya existían en ausencia de calcio.

El aumento en la concentración de CaCl_2 incorporado (geles con 30 mM) produjo un aumento en la cantidad de proteínas unidas débilmente a la red (solubilidad en BS *ca.* a 50% en los geles térmicos y *ca.* a 60% en los geles por APH, Figura 16b). Esto coincide con la idea de pérdida de proteínas al determinar la WHC de los geles (Sección 2.2. de este Capítulo). La mayor concentración de calcio produjo geles sin interacciones puente disulfuro, el agregado de los agentes desnaturalizantes en forma conjunta produjo solubilidades *ca.* a 100% indicando que todos los enlaces fueron no covalentes (Figura

16b). Estos datos indican que una concentración tan alta de calcio produjo un desbalance que deterioró la estructura de la matriz, aumentando la cantidad de proteína no unida a la red e interfiriendo con otros tipos de enlaces como los puentes disulfuro. Cabe destacar que algunos resultados de solubilidad proteica dieron valores por encima del 100% y se debería a un artificio de la determinación, en estos casos no se observó *pellet* luego de la centrifugación indicando solubilidad total del gel.

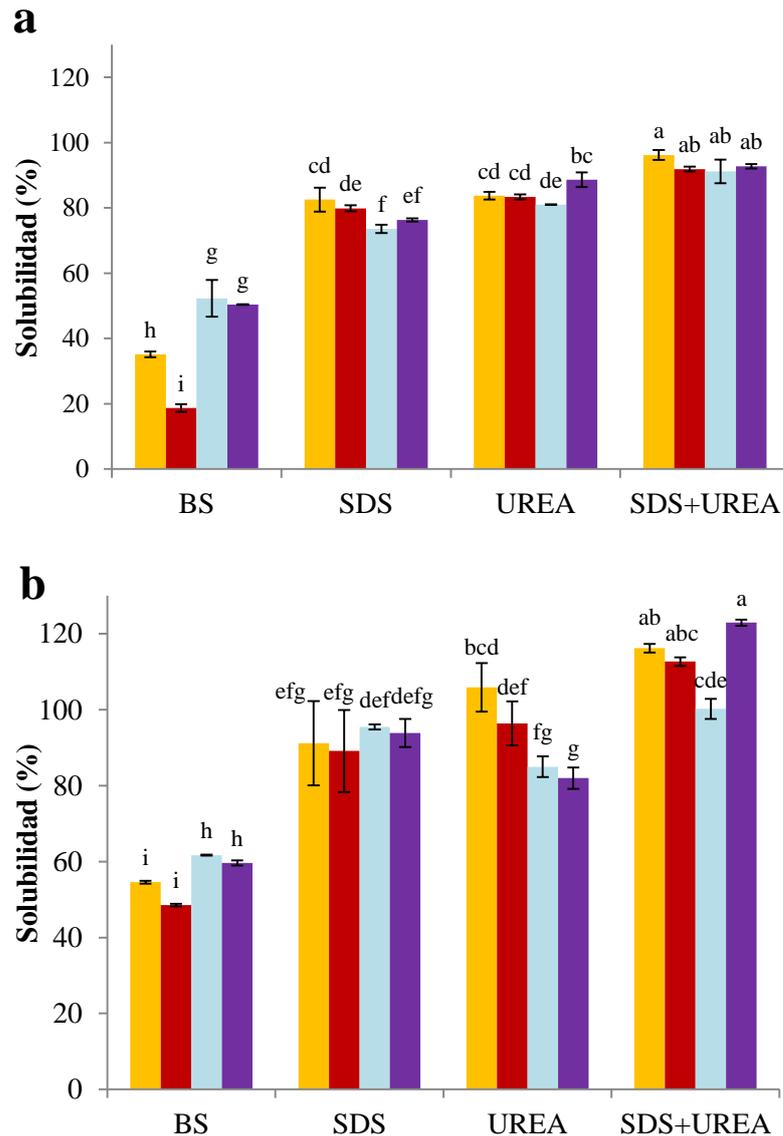


Figura 16: Solubilidad proteica (%) en *buffer* salino (BS) y en BS con agentes desnaturizantes SDS y/o UREA, de dispersiones de A10 al 7,5% con incorporación de calcio **a)** 15 mM y **b)** 30 mM, sometidas a TT a 70 (■) o 90 (■) °C, o a TAPH a 400 (■) o 600 (■) MPa. Promedio ± error estándar. Letras distintas en cada panel indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

2.5. Microestructura de la matriz proteica

Se realizó microscopía electrónica de barrido a geles de A10 con 10, 15 y 30 mM de calcio incorporado. Se observan estructuras agregadas, heterogéneas y con poros más grandes a mayor concentración de calcio incorporada en la matriz proteica (Figura 17). Estas estructuras se diferenciaron de la matriz compacta y homogénea de los geles sin calcio que se presentaron en la Sección 1.5. de este Capítulo (Figura 6). En los geles térmicos con baja concentración de calcio (10 y 15 mM) (Figura 17a, b d y e) se observaron indicios de filamentos finos de proteínas, agregados más pequeños así como poros de menor tamaño en comparación a los geles obtenidos por APH. Esto concuerda con la mayor capacidad de retención de agua que presentaron estos geles en comparación a los obtenidos por TAPH, lo que podría indicar que se tratara de geles mixtos. Estos geles estarían constituidos por ambos tipos de estructuras (filamentos de proteínas y agregados) y sus propiedades serían intermedias entre los geles de tipo finos y tipo particulados (Foegeding *et al.*, 1995). En los geles térmicos con 30 mM de CaCl₂ y en los geles obtenidos con TAPH a todas las concentraciones de calcio incorporadas se observaron agregados y poros de gran tamaño dando redes heterogéneas (Figura 17), lo que se considera una característica de geles particulados o agregados (Foegeding *et al.*, 1995; Remondetto *et al.*, 2002). Estas diferencias en el efecto de la concentración de calcio incorporada según el tratamiento aplicado para lograr la gelificación se vieron reflejadas en el comportamiento reológico y WHC de los geles.

Maltais *et al.*, (2005) observaron en geles fríos obtenidos a partir de proteínas de soja desnaturalizadas por calor y con incorporación de calcio, que al mantener constante la concentración de proteínas y aumentar la concentración de calcio aumentaba tanto el tamaño de los agregados como de los poros, provocando mayor expulsión de agua de la matriz dando menor WHC.

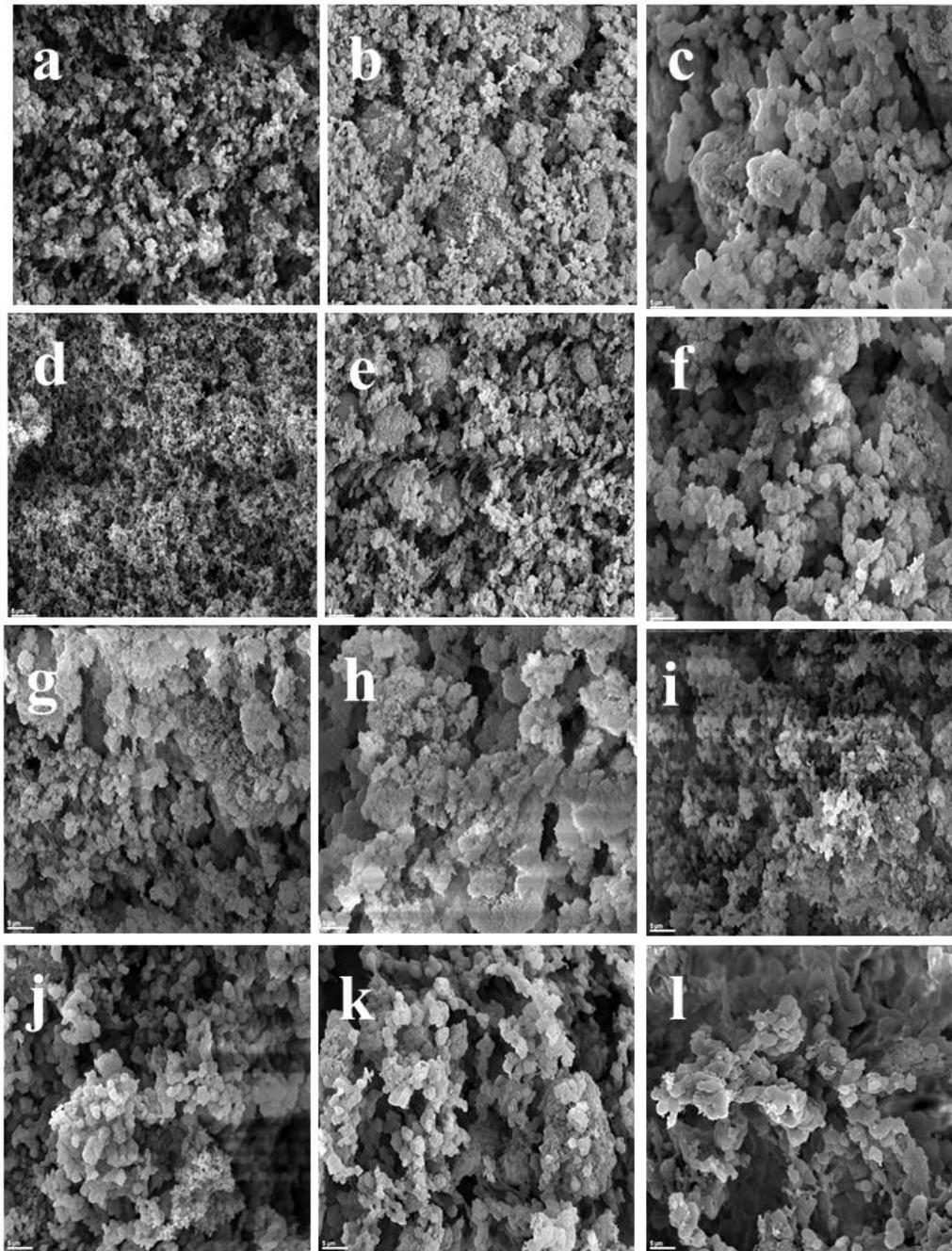


Figura 17: Microscopía electrónica de barrido de geles de A10 (7,5% p/p de proteína) obtenidos por TT a 70 °C (a, b y c) o 90 °C (d, e y f); o a TAPH a 400 MPa (g, h e i) o 600 MPa (j, k y l). A diferentes concentraciones de calcio incorporada: 10 mM (a, d, g y j); 15 mM (b, e, h y k) y 30 mM (c, f, i y l). Aumento 2000x.

2.6. Textura

El TPA de los geles con calcio obtenidos por los diferentes tratamientos se realizó únicamente a los geles auto-portantes. Con los tratamientos de mayor nivel (90 °C y 600 MPa) se obtuvieron geles auto-portantes a todas las concentraciones de calcio

incorporadas, observando diferencias significativas en la dureza. En los geles obtenidos a 90 °C la dureza aumentó al incrementar la concentración de calcio de 10 a 15 mM y luego no varió significativamente. Mientras que en los geles obtenidos con 600 MPa la dureza incrementó significativamente con cada incremento en la concentración de calcio y se obtuvieron los geles mas duros en comparación a los obtenidos por los otros tratamientos (Figura 18a). Las propiedades de adhesividad, cohesividad y elasticidad no fueron función de la concentración de calcio en estos geles y fueron semejantes entre los geles obtenidos con estos tratamientos que lograron la máxima desnaturalización proteica (Figura 18b, c y d).

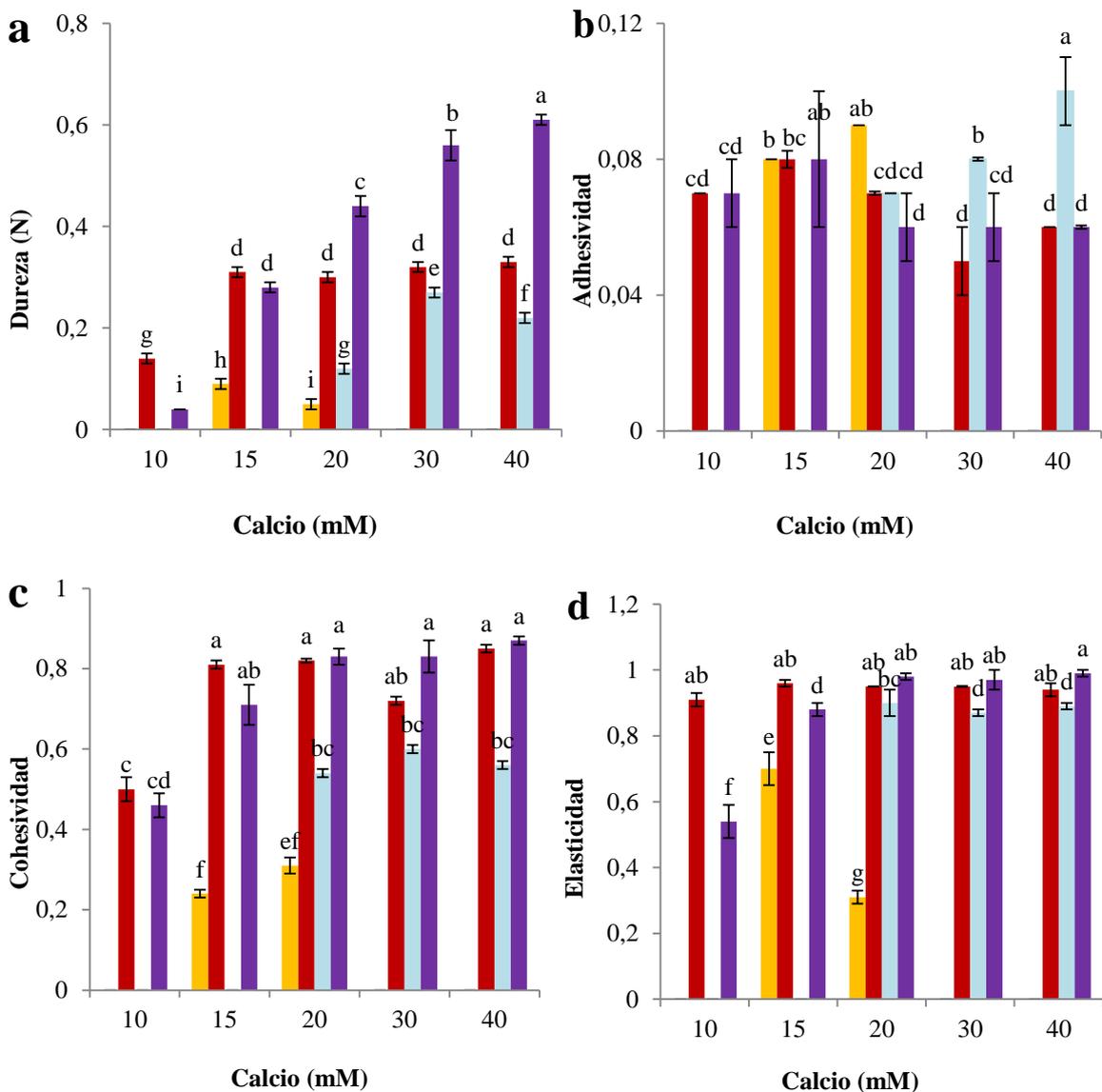


Figura 18: TPA de geles de A10 (al 7,5% p/p) en función de la concentración de calcio incorporado obtenidos por TT a 70 (■) o 90 (■) °C, o por TAPH a 400 (■) o 600 (■) MPa. Promedio ± error estándar. Letras distintas en un mismo panel indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Por otro lado, con los tratamientos de menor intensidad, se obtuvieron geles autoportantes con TT a 70 °C a menores concentraciones de calcio (10 y 15 mM) y con TAPH a 400 MPa a mayores (20, 30 y 40 mM). La dureza de los geles disminuyó al aumentar la concentración de calcio de 15 a 20 mM en los geles térmicos y aumentó al aumentar de 20 a 30 mM en los geles obtenidos por APH a 400 MPa (Figura 18a). La adhesividad de los geles aumentó con el incremento de la concentración de calcio principalmente en los geles obtenidos con el TAPH a 400 MPa y la elasticidad disminuyó (Figura 18b y d).

Los cambios encontrados en el TPA de los geles estudiados estarían relacionados con el grado de desnaturalización que provocó cada tratamiento aplicado y las diferencias en el efecto de la incorporación de calcio entre los geles obtenidos por TT o por TAPH indicarían diferentes mecanismos de gelificación en presencia de calcio. En los geles por APH el incremento de la concentración de calcio aumentaría la dureza de los geles en cambio en los geles térmicos la disminuiría.

2.7. Conclusiones parciales

La incorporación de calcio permitió obtener geles con menor concentración proteica tanto por TT como por TAPH. La presencia de calcio favoreció el establecimiento de nuevas interacciones atractivas entre polipéptidos permitiendo establecer una matriz con menos cantidad de proteína.

Con los tratamientos de mayor intensidad (90 °C y 600 MPa) la desnaturalización proteica fue completa, se obtuvieron geles fuertes con buena viscoelasticidad ($\tan \delta$ bajas) y duros. La elasticidad (G') y dureza de los geles térmicos fueron independientes de la concentración de calcio incorporada en el rango estudiado (10 a 40 mM), en cambio en los geles obtenidos por 600 MPa estos parámetros aumentaron por el aumento de calcio. Con los tratamientos de menor intensidad (70 °C y 400 MPa) la desnaturalización fue parcial y dependió de la concentración de calcio y se evidenciaron diferencias entre la gelificación térmica y la gelificación por APH. Para el TT a 70 °C el aumento de la concentración de calcio produjo geles menos elásticos (G' disminuyó), con mayor dependencia con la frecuencia (n aumentó) y menor viscoelasticidad ($\tan \delta$ aumentó) y menos duros. En cambio para el TAPH a 400 MPa el aumento de la concentración de calcio produjo geles más elásticos con menor dependencia con la frecuencia, mayor viscoelasticidad y más duros.

La presencia de calcio establece interacciones de tipo iónico que se sumaron a algunas de las que ya existían pero interfirieron con otras como los puentes disulfuro. Estas interacciones proteína-proteína se dieron a costa de disminuir las interacciones proteína-agua, es por ello que la gelificación en presencia de calcio generalmente genera geles de tipo agregados o particulados. En el caso de los geles térmicos a baja concentración de calcio (10 y 15 mM) se obtuvieron geles con WHC entre 60 - 80%, que serían mixtos (matriz proteica con indicios de estructuras filamentosas y agregadas); a altas concentraciones de calcio se obtuvieron geles de tipo agregados con menor WHC, mayor opacidad (mayor L*) y microestructura más heterogénea con poros de mayor tamaño. Por otro lado los geles obtenidos por APH presentaron características de geles agregados desde las concentraciones de calcio más bajas. En las condiciones analizadas, la concentración de calcio igual o mayor a 20 mM produjo un importante deterioro de la WHC, por lo que deberían estudiarse estrategias como incorporación de otro hidocoloide o aumento de la concentración proteica, para obtener geles con altas concentraciones de calcio y WHC aceptable.

Las diferencias del efecto de la concentración de calcio en las características de los geles obtenidos por TT o TAPH reforzaron la idea de que el mecanismo de gelificación inducida por estos tratamientos sería distinto también en presencia de calcio. Los TAPH serían aptos para formar geles más fuertes con mayor contenido de calcio, principalmente cuando se emplea mayor nivel de presión.

Conclusiones Generales



El cambio en el pH de extracción durante la obtención de aislados proteicos resultó una estrategia económica y simple de modificar estructuralmente a las proteínas de caupí. El pequeño grado de desnaturalización que presentó A10 a causa de este cambio produjo diferencias significativas con respecto a A8 en varias propiedades, principalmente en la hidrofobicidad superficial y también en la sensibilidad a los TT y TAPH. Estos aislados presentaron semejantes propiedades de solubilidad, WHC y viscosidad aparente, pero se diferenciaron en su capacidad de gelificación, en que A10 mostró mayor capacidad que A8.

Es frecuente que los aislados de proteínas vegetales requieran algún procesamiento, por ejemplo aplicación de calor, para reducir la presencia de factores antinutricionales, eliminar sustancias que afectan el sabor y aumentar la digestibilidad de las proteínas, a la vez que se busca que no se deteriore la funcionalidad de las mismas. En este sentido, los TT y los TAPH indujeron cambios más drásticos en las propiedades fisicoquímicas y funcionales de A8 que de A10. La alta solubilidad en agua de los APC tanto antes como después de los tratamientos fue una característica destacable en el contexto de las proteínas vegetales. La solubilidad de A10 no cambió significativamente luego de los tratamientos y en muchas condiciones ensayadas fue mayor al 90%, en A8 se encontró el menor valor (72%) con el TT a 70 °C. Por lo tanto, los APC podrían ser utilizados en la formulación de alimentos que requieran alta solubilidad proteica y deban ser pasteurizados por TT o TAPH durante su procesamiento, como bebidas fortificadas. Los TAPH fueron más eficientes que los TT para mejorar ciertas propiedades funcionales, como la LGC y la WHC de ambos aislados. Las APH podrían reemplazar a los TT como tecnología de conservación en productos con APC que requieran buena capacidad de gelificación y retención de agua, por ejemplo en productos cárnicos o como sustitutos de proteínas cárnicas.

La capacidad de formar geles térmicos de los APC fue semejante a la de otras proteínas vegetales de reserva en términos de concentración crítica. Sin embargo, las proteínas de caupí presentaron una importante capacidad de establecer interacciones entre sí por lo que la gelificación térmica comenzó antes de que se alcanzara un alto grado de desnaturalización, lo que las diferenció de otras proteínas vegetales. Las propiedades reológicas de los geles obtenidos dependieron de la concentración proteica, la temperatura del TT y la velocidad de calentamiento y enfriamiento. Los APC formaron geles con buenas propiedades reológicas con TT a 80 °C, una temperatura relativamente baja para la gelificación de proteínas vegetales. Las interacciones que estabilizaron las matrices de

estos geles se establecieron en menor proporción durante el calentamiento (hidrofóbicas y puentes disulfuro) y en mayor proporción durante el enfriamiento (puentes de hidrógeno). En términos de concentración crítica, A10 necesitó menor concentración proteica que A8 para formar geles con elevado módulo elástico y baja $\tan \delta$. A temperaturas como 70 y 80 °C A10 formó geles más elásticos que A8. Esta mejor capacidad de gelificación de A10 podría deberse a la mayor hidrofobicidad superficial de sus proteínas y/o al mayor contenido de sal a causa del proceso de obtención. A temperaturas más altas (90 y 95 °C) las diferencias entre A8 y A10 se cancelaron, probablemente por el mayor grado de desnaturalización, que enmascararía algunas diferencias iniciales entre ambos aislados. La selección de uno u otro aislado dependería de las características texturales que se deseen obtener y las temperaturas a las que se deba someter el producto alimenticio, la elección de A10 sería ventajosa en la preparación de alimentos en que se requiriera aplicar TT de baja intensidad.

Se pudo lograr la formación de geles débiles de A10 a partir de 10,5% p/p con TT de 20 min a 70 °C y a partir de 9,0% p/p con TT de 20 min a 90 °C. Con ambas temperaturas de TT el aumento de la concentración proteica produjo geles térmicos más fuertes y duros con muy alta WHC, sin diferencias significativas en la dureza y WHC por el aumento de la temperatura.

Nuestros resultados indican que las APH pueden ser empleadas para modificar la gelificación térmica de las proteínas de caupí. El pre-tratamiento con APH a bajas concentraciones proteicas no favoreció la gelificación térmica, pero aumentó las interacciones entre las proteínas durante el calentamiento dando soluciones más viscoelásticas, por lo cual APC modificados por APH podrían emplearse como espesantes para alimentos como sopas o salsas que se consumen en caliente. En cambio a altas concentraciones (a partir de 10,5% p/p) el pre-tratamiento con APH permitió obtener geles térmicos a menores temperaturas (50 o 60 °C dependiendo del nivel de presión utilizado). Por lo que se podrían usar en estrategias de gelificación en que se busque retener sustancias termolábiles. Los efectos de los pre-tratamientos con APH en estos geles dependieron fuertemente de la temperatura que se alcanzó durante el ciclo térmico, hasta 80 °C en ambos aislados se observó un fortalecimiento de la matriz debido al pre-tratamiento, que fue mayor cuanto mayor fue el nivel de presión aplicado. En cambio, a partir de 90 °C, el fortalecimiento en A10 fue de gran magnitud solo a 400 MPa, mientras que en A8 no se detectaron cambios significativos con ningún valor de presión. En los geles obtenidos con pre-tratamiento APH la contribución a G' durante el enfriamiento fue

menor que en los no pre-tratados. Esto sugiere que las APH permitieron aumentar la proporción de interacciones hidrofóbicas en los geles térmicos, probablemente por el aumento de la hidrofobicidad superficial generado por el TAPH.

La gelificación por APH requirió mayor concentración proteica que la gelificación térmica (a partir de 13,5% p/p al aplicar 400 MPa y a partir de 12% p/p al aplicar 600 MPa). Las propiedades de los geles obtenidos por TAPH fueron función del nivel de presión utilizada. Los geles a 600 MPa presentan dureza y viscoelasticidad semejante a la de los geles térmicos, mientras que los geles a 400 MPa fueron más débiles. Los geles obtenidos por APH presentaron una matriz proteica compacta y homogénea como los geles térmicos pero con predominio de interacciones puente de hidrógeno y menor cantidad de puentes disulfuro. En base a esto, el TAPH se presenta como una alternativa que permite obtener geles proteicos de caupí sin la necesidad de TT (geles fríos) ventaja que se puede utilizar para la obtención de matrices proteicas capaces de contener sustancias lábiles al calor, así como también satisfacer la demanda creciente de productos mínimamente procesados y sin conservantes químicos. Tanto los geles térmicos como los obtenidos por TAPH exhibieron una excelente WHC (mayor al 95% cuando fue evaluada en condiciones muy enérgicas).

La incorporación de calcio permitió gelificar los aislados proteicos de caupí por TT y por TAPH a baja concentración proteica (7,5%). El calcio modificó las interacciones proteína-proteína, estableciendo nuevos enlaces (como los salinos) pero disminuyendo los puentes disulfuro, el balance generó geles más elásticos. Con las mayores concentraciones de calcio se desbalancearon las interacciones, deteriorándose aquellas entre las proteínas y el agua obteniéndose geles con baja WHC, sinéresis espontánea y del tipo agregado o particulado. Este comportamiento dependió de la concentración de calcio incorporada y del nivel de temperatura o presión utilizado. Los geles térmicos con baja concentración de calcio (10 y 15 mM) presentaron características de geles tipo mixto, con matrices con estructuras de filamentos finos y de agregados, buen comportamiento reológico y buena WHC. En cambio los geles obtenidos por TAPH mejoran su comportamiento reológico a altas concentraciones de calcio (30 o 40 mM) pero mantuvieron una baja WHC. La incorporación de calcio varió la tonalidad marrón/ámbar de los geles de caupí a tonalidades blanquecina debido a la insolubilización proteica. En base a estos resultados, las proteínas de caupí se podrían emplear en la elaboración de productos similar lácteos fortificados con calcio (yogurt, quesos). La WHC de estos sistemas podría mejorarse aumentando la concentración proteica o incorporando otro hidrocólide.

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten concluir que la capacidad de gelificación de APC es muy versátil ya que la aplicación de TT y TAPH (tanto durante la gelificación o como pre-tratamiento), así como la incorporación de calcio modificaron las propiedades de los geles obtenidos. Esto representa un punto de partida para expandir el uso de proteínas de caupí mediante el desarrollo de nuevos productos con características texturales definidas. De esta forma se contribuye con información para la actual búsqueda de proteínas vegetales que reemplacen las de origen animal, lo que conduciría a beneficios tanto ecológicos como para la salud humana.

Referencias Bibliográficas



- Aguilera, Y., Esteban, R. M., Benítez, V., Mollá, E., & Martín-Cabrejas, M. A. (2009). Starch, Functional Properties, and Microstructural Characteristics in Chickpea and Lentil As Affected by Thermal Processing. *J. Agric. Food Chem.*, *57*, 10682-10688.
- Aguinaga, A. (2003). Poroto caupí: una alternativa para todos los productores. Información para extensión INTA-EEA “El Colorado”. Disponible en: <https://inta.gov.ar/documentos/poroto-caupi-una-alternativa-para-todos-los-productores>
- Ahmed, J., Ramaswamy, H. S., & Alli, I. (2006). Thermorheological Characteristics of Soybean Protein Isolate. *J. Food Sci.*, *71*, 158–163.
- Albán, M. (2012). Manual de cultivo de frijol caupí. Primera edición Piura, Perú. Disponible en: http://www.swisscontact.org/fileadmin/user_upload/COUNTRIES/Peru/Documents/Publications/CAUPI.pdf
- Alberto, E. (2005). Comunicación personal. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA ISSN 1851-8915). AER Laguna Blanca. Formosa.
- Alvarez, P. A., Ramaswamy, H. S., & Ismail, A. A. (2008). High pressure gelation of soy proteins: Effect of concentration, pH and additives. *J Food Eng.*, *88*, 331–340.
- Amjad, I., Khalil, I. A., Shah, H. (2003). Nutritional yield and amino acid profile of rice protein as influenced by nitrogen fertilizer. *Sarhad J. Agric.*, *19*, 127–134.
- Añón, M. C., De Lamballerie, M., & Speroni, F. (2011). Influence of NaCl concentration and high pressure treatment on thermal denaturation of soybean proteins. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, *12*, 443-450.
- AOAC, Official methods of analysis. (1990). Eds 15th. Association of Official Analytical Chemists, INC. Arlington, Virginia, USA.
- Arntfield, S. D., & Murray, E. D. (1992). Heating Rate Affects Thermal Properties and Network Formation for Vicilin and Ovalbumin at Various pH Values. *J. Food Sci.*, *57*, 3-9.
- Arntfield, S. D., Murray, E. D., & Ismond, M. A. H. (1986). Effect of salt on the thermal-stability of storage proteins from Fababean (*Vicia faba*). *J. Food Sci.*, *51*, 371-377.
- Arntfield, S. D., Murray, E. D., & Ismond, M. A. H. (1990). Influence of Protein Charge on Thermal Properties as Well as Microstructure and Rheology of Heat Induced Networks for Ovalbumin and Vicilin. *J. Texture Stud.*, *21*, 295–322.
- Arntfield, S. D., Murray, E. D., Ismond, M. A. H., & Bernatsky, A. M. (1989). Role of the Thermal Denaturation-Aggregation Relationship in Determining the Rheological Properties of Heat Induced Networks for Ovalbumin and Vicilin. *J. Food Sci.*, *54*, 1624–1631.
- Avanza, M. V, Puppó, M. C., & Añón, M. C. (2005a). Rheological characterization of amaranth protein gels. *Food Hydrocoll.*, *19*, 889-898.
- Avanza, M. V., & Añón, M. C. (2007). Effect of thermal treatment on the proteins of amaranth isolates. *J. Sci. Food Agric.*, *87*, 616–623.

- Avanza, M. V., Acevedo, B. A., Chaves, M. G., Aphalo, P., & Añón, M. C. (2015). Physicochemical and structural properties of major protein fractions of two varieties of nea-cowpea (*Vigna unguiculata L.*): a comparative study. *Int. J. Food Nutr. Sci.*, *4*, 240-247.
- Avanza, M. V., Chaves, M. G., Acevedo, B. A., & Añón, M. C. (2012). Functional properties and microstructure of cowpea cultivated in north-east Argentina. *Food Sci. Technol.*, *49*, 123-130.
- Avanza, M. V., Puppo, M. C., & Añón, M. C. (2005b). Structural Characterization of Amaranth Protein Gels. *J. Food Sci.*, *70*, 223-229.
- Avanza, M., Acevedo, B., Chaves, M., & Añón, M. (2013). Nutritional and anti-nutritional components of four cowpea varieties under thermal treatments: Principal component analysis. *Food Sci. Technol.*, *51*, 148-157.
- Avila-Ruiz G., Xiao, W., Van Boekel, M., Minor, M. & Stieger, M. (2016). Effect of extraction pH on heat-induced aggregation, gelation and microstructure of protein isolate from quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*). *Food Chem.*, *209*, 203-210.
- Balny, C., & Masson, P. (1993). Effects of high pressure on proteins. *Food Rev. Int.*, *9*, 611-628.
- Barbu, E., & Joly, M. (1953). The globular-fibrous protein transformation. *Discuss. Faraday Soc.*, *13*, 77-93.
- Bartholomai, G.B., & Pilosof, A.M. (2000). Caracterización funcional y estructural de proteínas. EUDEBA. CYTED. Buenos Aires, Argentina. IL.
- Bera, M. B., & Mukherjee, R. K. (1989). Solubility, Emulsifying, and Foaming Properties Bran Protein Concentrates of Rice Bran Protein Concentrates. *J. Food Sci.*, *54*, 142-145.
- Bernardino-Nicanor, A., Añón, M. C., Scilingo, A. A., & Dávila-Ortiz, G. (2005). Functional properties of guava seed glutelins. *J. Agric. Food Chem.*, *53*, 3613-3617.
- Blayo, C., Marchal, S., Lange, R., & Dumay, E. (2014). Retinol binding to β -lactoglobulin or phosphocasein micelles under high pressure: Effects of isostatic high-pressure on structural and functional integrity. *Food Res. Int.*, *55*, 324-335.
- Boonyaratanakornkit, B. B., Park, C. B., & Clark, D. S. (2002). Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, *1595*, 235-249.
- Bourne, M. C. (1968). Texture profile of ripening pears. *J. Food Sci.*, *33*, 223-226.
- Bryant, C. M., & McClements, D. J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends Food Sci. Technol.*, *9*, 143-151.
- Calvo, C., & Duran, L. (2002). Propiedades físicas II. Ópticas y color. Tecnología de Alimentos. CYTED. Vol. 1.
- Camou, J. P., Sebranek, J. G., & Olson, D. G. (1989). Effect of Heating Rate and Protein Concentration on Gel Strength and Water Loss of Muscle Protein Gels Gel strength. *J. Food Sci.*, *54*, 850-854.

- Cardamone, M., & Puri, N. K. (1992). Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins. *Biochem. J.*, 282, 589-593.
- Chan, C., & Phillips, R. D. (1994). Amino Acid Composition and Subunit Constitution of Protein Fractions from Cowpea (*Vigna Unguiculata* L. Walp) Seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1857–1860.
- Chantrapornchai, W., & McClements, D.J. (2002). Influence of NaCl on optical properties, large-strain rheology and water holding capacity of heat-induced whey protein isolate gels. *Food Hydrocoll.*, 16, 461–6.
- Chapleau, N., & De Lamballerie-Anton, M. (2003). Improvement of emulsifying properties of lupin proteins by high pressure induced aggregation. *Food Hydrocoll.*, 17, 273-280.
- Cheftel, J. C., Cuq, J. L. y Lorient, D. (1989). Proteínas Alimentarias Editorial. Acribia, Zaragoza, España.
- Cheung L., & J. Wanasundara, (2014). The Effect of pH and NaCl Levels on the Physicochemical and Emulsifying Properties of a Cruciferin Protein Isolate. *Food Biophys.*, 9, 105-113.
- Clark, A. H., & Ross-Murphy, S. B. (1987). Structural and Mechanical Properties of Biopolymer Gels. *Adv. Polym. Sci.*, 83, 60-192.
- Código Alimentario Argentino. (Capítulo XI, artículo 885; Capítulo XIX, Artículo 1411). Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp
- Coffmann, C. W., & Garcia, V. V. (1977). Functional properties and amino acid content of a protein isolate from mung bean flour. *J. Food Technol.*, 12, 473-484.
- Colombo, A., Ribotta, P. D., & León, A. E. (2010). Differential scanning calorimetry (DSC) studies on the thermal properties of peanut proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 4434–4439.
- Condés, M. C., Speroni, F., Mauri, A., & Añón, M. C. (2012). Physicochemical and structural properties of amaranth protein isolates treated with high pressure. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 14, 11–17.
- Damodaran, S. (1988). Refolding of thermally unfolded soy proteins during the cooling regime of the gelation process: effect on gelation. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 262-269.
- Damodaran, S. (1989). Interrelationship of Molecular and Functional Properties of Food Proteins. En Food Proteins; Kinsella, J. E., Soucie, W. G., Eds.; American Oil Chemists' Society: Champaign,
- Damodaran, S. (2010). Aminoácidos, péptidos y proteínas. En Fennema, química de los alimentos. Acribia, Capítulo 6, Tercera edición.
- Deng, J., Toledo, R. T., & Lillard, D. A. (1976). Effect of temperature and pH on protein-protein interaction in actomyosin solutions. *J. Food Sci.*, 41, 273-277.
- Deshpande, S. S. (1992). Food legumes in human nutrition: A personal perspective. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32, 333-363.

- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C.W. (2016). *InfoStat versión 2016*. Córdoba, Argentina: FCA, Universidad Nacional de Córdoba.
- Doi, E. (1993). Gels and gelling of globular proteins. *Trends Food Sci. Technol.*, 4, 1–5.
- Donovan, J. W., & Beardslee, R. A. (1975). Heat Stabilization Produced by Protein-Protein Association. *J. Biol. Chem.*, 250, 1966-1971.
- Duke, J. A. (1981). Handbook of legumes of world economic importance. Plenum Press. New York.
- Dunwell, J.M. (1998). Cupins: a new superfamily of functionally diverse proteins that include germins and plant storage proteins. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 15, 1–32.
- Dyer, R. J. (1973). Aplicaciones de espectroscopía de absorción en compuestos orgánicos. Prentice-Hall.
- FAO (2007). Base de datos estadísticos FAOSTAT-Suministro Alimentario, (1961-2007). Disponible en: <http://www.faostat.fao.org.ste>.
- FAO. (2016). Base de datos estadísticos FAOSTAT. Disponible en: <http://www.fao.org/pulses-2016/es/>.
- Farzana, W. y Khalil, I. A. (1999). Protein quality of tropical food legumes. *J. Sci. Tech.*, 23, 13–19.
- Ferry, J. D. (1948). Protein Gels. *Adv. Protein Chem.*, 4, 1-78.
- Foegeding, E. A., Bowland, E. L. & Hardin, C. C. (1995). Factors that determine the fracture properties and microstructure of globular protein gels. *Food Hydrocoll.*, 9, 237-249.
- Freire Filho, F. R.; Queiróz Ribeiro, V.; Barreto, P. D. y Fernandes Santos. C. A. (2002). Melhoramento genético de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na região do Nordeste. EMBRAPA, Brasil. Disponible en: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/melhoramento.genetico.caupi1_000flv5utul02wyiv80kxlb36w9k8dko.pdf.
- Freitas, R. L., Teixeira, A. R., & Ferreira, R. B. (2004). Characterization of the Proteins from *Vigna unguiculata* Seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 1682-1687.
- Gálvez Mariscal, A., Flores Argüello, I., & Farrés Gonzáles Sarabia, A. (2013). Proteínas. Química de los alimentos. Capítulo 3, Quinta edición. PEARSON,
- Gekko, K., & Hasegawa, Y. (1986). Compressibility-Structure Relationship of Globular Proteins. *Biochemistry*, 25, 6563-6571.
- Gossett, P. W., Rizvi, S. S. H., & Baker, R. C. (1984). Symposium: Gelation in Food Protein Systems Quantitative Analysis of Gelation in Egg Protein Systems. *Food Technol.*, 38, 67–96.
- Granito, M., Guerra, M., Torres, A., & Guinand, J. (2004). Efecto del procesamiento sobre las propiedades funcionales de *Vigna Sinensis*. *Interciencia*, 29, 521-526.
- Grasso, D., La Rosa, C., Milardi, D., & Fasone, S. (1995). The effects of scan rate and protein concentration on DSC thermograms of bovine superoxide dismutase. *Thermochim. Acta*, 265, 163-175.

- Guo, J., Zhang, Y., & Yang, X. Q. (2012). A novel enzyme cross-linked gelation method for preparing food globular protein-based transparent hydrogel. *Food Hydrocoll.*, 26, 277-285.
- Hayashi, R. (1989). En Engineering and Food (W. E. L. Spiess and Schubert, H, eds.), Elsevier Applied Science, London. 815-826.
- Hayashi, R. (1991). High Pressure in Food Processing and Preservation: Principle, Application and Development. *High Press. Res.*, 7, 15–21.
- He, R., He, H. Y., Chao, D., Ju, X., & Aluko, R. (2014). Effects of High Pressure and Heat Treatments on Physicochemical and Gelation Properties of Rapeseed Protein Isolate. *Food Bioproc. Tech.*, 7, 1344–1353.
- He, X. H., Liu, H. Z., Liu, L., Zhao, G. L., Wang, Q., & Chen, Q. L. (2014). Effects of high pressure on the physicochemical and functional properties of peanut protein isolates. *Food Hydrocoll.*, 36, 123–129.
- Heertje, I. (1993). Structure and function of food products: a review. *Food Struct.*, 12, 343-364.
- Hendrix, T., Griko, Y. V., & Privalov, P. L. (2000). A calorimetric study of the influence of calcium on the stability of bovine α -lactalbumin. *Biophys. Chem.*, 84, 27-34.
- Heremans, K. (1982). High pressure effects on proteins and other biomolecules. *Ann. Rev Biophys. Bioeng.* 11, 1-21.
- Hermansson, A. (1978). Physicochemical aspects of soy proteins structure. *J. Text. Stud.*, 9, 33-58.
- Hermansson, A. M. (1986). Soy Protein Gelation. *JAOCS*, 63, 658-666.
- Hermansson, A. M. (1994). Microstructure of protein gels related to functionality. En Protein structure-function relationships in foods. R. Y. Yada, R. L. Jackman & J. L. Smith, Blackie Academic and Professional. London.
- Hermansson, A. M., & Langton, M. (1994). Electron microscopy. En: Physical Techniques for the study of Food Biopolymers. S. B. Ross-Murphy. (Ed), Elsevier. London,
- Horax, R., Hettiarachchy, N. S., Chen, P., & Jalaluddin, M. (2004a). Preparation and characterization of protein isolate from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *J. Food Sci.*, 69, 114-118.
- Horax, R., Hettiarachchy, N. S., Chen, P., & Jalaluddin, M. (2004b). Functional properties of protein isolate from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *J. Food Sci.*, 69, 119-121.
- Hu, H., Fan, X., Zhou, Z., Xu, X., Fan, G., Wang, L., Huang, X., Pan, S., & Zhu, L. (2013a). Acid-induced gelation behavior of soybean protein isolate with high intensity ultrasonic pre-treatments. *Ultrason. Sonochem.*, 20, 187-195.
- Hu, H., Li-chan, E. C. Y., Wan, L., Tian, M., & Pan, S. (2013b). The effect of high intensity ultrasonic pre-treatment on the properties of soybean protein isolate gel induced by calcium sulfate. *Food Hydrocoll.*, 32, 303-311.

- Hugo, A.A., Pérez, P. F., Añón, M. C., & Speroni, F. (2014). Incorporation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* (CIDCA 133) in cold-set gels made from high pressure-treated soybean proteins. *Food Hydrocoll.*, *37*, 34-39.
- Ionescu, A. M., Alaminos, M., Carmona, J. de la C., García-López Durán, J. de D., González-Andrades, M., Ghinea, R., Campos, A., Hita, E., Pérez, M. del M. (2011). Investigating a novel nanostructured fibrin-agarose biomaterial for human cornea tissue engineering: Rheological properties. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, *4*, 1963–1973.
- Jover, P.L. (2003). Tecnología de producción y manejo poroto caupí. Información para extensión INTA-EEA Colonia Benítez, Chaco.
- Jover, P.L. (2006). Poroto caupí. Información para extensión INTA - EEA Colonia Benítez, Chaco.
- Kaur, M., & Singh, N. (2007). Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food Chem.*, *102*, 366-374.
- Khalid, I. I., & Elharadallou, S. B. (2013). Nutrition & Food Functional Properties of Cowpea (*Vigna Ungiculata* L. Walp), and Lupin (*Lupinus Termis*) Flour and Protein Isolates. *Am. J. Food Technol.*, *3*, 113-122.
- Khalid, I. I., Elhardallou, S. B., & Elkhalifa, E. A. (2012). Composition and functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) flour and protein isolates. *Am. J. Food Technol.*, *7*, 113–122.
- Kilara, A., Sharkasi, T. Y. & Morr, C. V. (1986). Effects of temperature on food proteins and its implications on functional properties, *Crit Rev Food Sci Nutr.*, *23*, 323-395
- Kim, H., Kim, B. Y., Gunasekaran, S., Park, J. W., & Yoon, W. B. (2013). Comparison of Concentration Dependence of Mechanical Modulus in Two Biopolymer Gel Systems using Scaling Analysis. *Food Sci. Biotechnol.*, *22*, 1601-1606.
- Kinsella, J. E., & Melachouris, N. (1976). Functional properties of proteins in foods: A survey. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, *7*, 219–280.
- Knorr, D., Heinz, V., & Buckow, R. (2006.) High pressure application for food biopolymers. *Biochim. Biophys. Acta*, *1764*, 619–631.
- Kroll, R. D. (1984). Effect of pH on the binding of Calcium Ions by Soybean Proteins. *Cereal Chem.*, *61*, 490-495.
- Kronman, M. J., & Holmes, L. G. (1971). Fluorescence of Native, Denatured and Reduced-Denatured Proteins. *Photochem. Photobiol.*, *14*, 113-134.
- Kumagai, H., Fujii, T., Inukai, T., & Yano, T. (1993). Concentration Dependence of Mechanical Properties of Gelatin near the Sol-Gel Transition Point. *Biosci. Biotech. Biochem.*, *57*, 532-535.
- Kurganov, B. I., Kornilaev, B. A., Chebotareva, N. A., Malikov, V. P., Orlov, V. N., Lyubarev, A. E., & Livanova, N. B. (2000). Dissociative mechanism of thermal denaturation of rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase b. *Biochemistry*, *39*, 13144–13152.

- Laemmli, U. K. (1970). Clavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 277, 680-685.
- Lakowicz, J. R. (1983). Principles of fluorescence spectroscopy. 3^o edition. New York: Springer Science Business Media.
- Lange, R., & Balny, C. (2002). UV-visible derivative spectroscopy under high pressure. *Biochim. Biophys. Acta*, 1595, 80-93.
- Lange, R., Bec, N., Mozhaev, V. V., & Frank, J. (1996b). Fourth derivative UV-spectroscopy of proteins under high pressure. II. Application to reversible structural changes. *Eur. Biophys. J.*, 24, 284-292.
- Lange, R., Frank, J., Saldana, J. L., & Balny, C. (1996a). Fourth derivative UV-spectroscopy of proteins under high pressure. I. Factors affecting the fourth derivative spectrum of the aromatic amino acids. *Eur Biophys J*, 24, 277–283.
- Le Bon, C., Nicolai, T., & Durand, D. (1999). Kinetics of Aggregation and Gelation of Globular Proteins after Heat-Induced Denaturation. *Macromolecules*, 32, 6120-6127.
- Lezcano, E. (2009). Legumbres secas. *Alimentos Argentinos*, 45, 20–27.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265–267.
- Lullien-Pellerin, V., Popineau, Y., Meersman, F., Morel, M. H., Heremans, K., Lange, R., & Balny, C. (2001). Reversible changes of the wheat γ 46 gliadin conformation submitted to high pressures and temperatures. *Eur. J. Biochem.*, 268, 5705-5712.
- Ma, C. Y., & Harwalkar, V. R. (1988). Study of Thermal Denaturation of Oat Globulin by Ultraviolet and Fluorescence Spectrophotometry. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 155-160.
- Maltais, A., Remondetto, G. E., Gonzalez, R., & Subirade, M. (2005). Formation of Soy Protein Isolate Cold-set Gels: Protein and Salt Effects. *J. Food Sci.*, 70, 67-73.
- Manassero, C. A., Vaudagna, S. R., Añón, M. C., & Speroni, F. (2015). High hydrostatic pressure improves protein solubility and dispersion stability of mineral-added soybean protein isolate. *Food Hydrocoll.*, 43, 629 –635.
- Matsumura, Y., & Mori, T. (1996). Gelation. Capítulo 4. En *Methods of Testing Protein Functionality*. Ed. Hall, G.M. Blackie Academic & Professional, London, UK.
- Meng, G. T., Ching, K. M., & Ma, C. Y. (2002). Thermal aggregation of globulin from an indigenous Chinese legume, *Phaseolus angularis* (red bean). *Food Chem*, 79, 93-103.
- Mession, J. L., Sok, N., Assifaoui, A., & Saurel, R. (2013). Thermal Denaturation of Pea Globulins (*Pisum sativum* L.)—Molecular Interactions Leading to Heat-Induced Protein Aggregation. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 1196-1204.
- Mirmoghtadaie, L., Shojaee Aljabadi, S., & Hosseini, S. M. (2016). Recent approaches in physical modification of protein functionality. *Food Chem*, 199, 619-627.

- Molina Ortiz, S. E., & Wagner, R. (2002). Hydrolyses of native and modified soy protein isolate: structural characteristic, solubility and foaming properties. *Food Res. Int.* 35, 6, 511-518.
- Molina, E., Defaye, A. B., & Ledward, D. A. (2002). Soy protein pressure-induced gels. *Food Hydrocoll.*, 16, 625–632.
- Molina, E., Papadopoulou, A., & Ledward, D. A. (2001). Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. *Food Hydrocoll.*, 15, 263-269.
- Molina, M. R., Argueta, C. E., & Bressani, R. (1976). Protein-starch extraction and nutritive value of the black-eyed pea (*Vigna sinensis*) and its protein concentrates. *J. Food Sci.*, 41, 928-932.
- Monahan, F. (1995). Effect of pH and temperature on protein unfolding and thiol/disulfide interchange reactions during heat-induced gelation of whey proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 46-52.
- Mooney, M. (1959). A diffusion theory of the visco-elasticity of rubbery polymers in finite elastic strain. *J. Polym. Sci.*, 34, 599-626.
- Mozhaev, V. V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P., & Balny, C. (1996). High pressure effects on protein structure and function. *Protein. Struct. Funct. Genet.*, 24, 81-91.
- Müntz, K. (1998). Deposition of storage proteins. *Plant Mol. Biol.* 38, 77-99.
- Mwasaru, M. A., Muhammad, K., Bakar, J., & Che Man, Y. B. (1999a). Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeon pea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates: I. Physicochemical properties. *Food Chem.*, 67, 435–443.
- Mwasaru, M. A., Muhammad, K., Bakar, J., & Che Man, Y. B. (1999b). Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. II. Functional properties. *Food Chem.*, 67, 445-452.
- Myers, C.D. (1990). En *Thermal Analysis of Food*, Editado por V.R. Harwalkar & C. Y. Ma. Elsevier Appl. Science, London
- Nemati, M., Oveisi, M. R., Abdollahi, H. & Sabzevari, O. (2004). Differential of bovine and porcine gelatins using principal component analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 18, 485-492.
- O’Kane, F. E., Vereijken, J. M., Gruppen, H., & Boekel, M. A. J. S. (2005). Gelation Behavior of Protein Isolates Extracted from 5 Cultivars of *Pisum sativum* L. *J. Food Sci.*, 70, 132–137.
- O’Reilly, C. E., Kelly, A. L., Murphy, P. M., & Beresford, T. P. (2001). High pressure treatment: Applications in cheese manufacture and ripening. *Trends Food Sci. Tech.*, 12, 51-59.
- Okamoto, M., Kawamura, Y., & Hayashi, R. (1990). Application of High Pressure to Food Processing: Textural Comparison of Pressure- and Heat-induced Gels of Food Proteins. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 183–189.
- Osborne, T. (1924). *The Vegetable Proteins*. Segunda edición. Longmans y Green, Nueva York.

- Permyakov, E. A. (1993). Luminescent spectroscopy of proteins. Capítulo 3. Primera Edición. Florida: CRC Press, Inc
- Petrucelli, S., & Anon, M. C. (1994). Relationship between the Method of Obtention and the Structural and Functional Properties of Soy Proteins Isolates. 1. Structural and Hydration Properties. *J. Agric. Food Chem.*, *42*, 2161-2169.
- Petrucelli, S., & Añón, M. C. (1995). Thermal Aggregation of Soy Protein Isolates. *J. Agric. Food Chem.*, *43*, 3035-3041.
- Petrucelli, S., Zamponi, R. A., Jovanovich, G., & Añón, M. C. (1993). Characterization of Fermented Cassava Starches. *J. Food Biochem.*, *17*, 161-172.
- Pilosof, A. M. R. (2000a). Propiedades de hidratación. En A. M. R. Pilosof & G. B. Bartholomai. Caracterización funcional y estructural de proteínas. Capítulo 1. Eudeba. CYTED. Buenos Aires, Argentina.
- Pilosof, A. M. R. (2000b). Gelificación. En A. M. R. Pilosof & G. B. Bartholomai. Caracterización funcional y estructural de proteínas. Capítulo 4. Eudeba. CYTED. Buenos Aires, Argentina.
- Pimentel, D., & Pimentel, M. (2003). Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. *Am. J. Clin. Nutr.*; *78*, 660-663.
- Prinyawiwatkul, W., Beuchat, L. R., McWatters, K. H., & Phillips, R. D. (1997). Functional Properties of Cowpea (*Vigna unguiculata*) Flour as Affected by Soaking, Boiling, and Fungal Fermentation. *J. Agric. Food Chem.*, *45*, 480-486.
- Privalov, P. L. (1979). Stability of proteins: small globular proteins. *Adv. Protein Chem.*, *33*, 167-241.
- Puppo, C., Chapleau, N., Speroni, F., De Lamballerie-Anton, M., Michel, F., Añón, C., & Anton, M. (2004). Physicochemical Modifications of High-Pressure-Treated Soybean Protein Isolates. *J. Agric. Food Chem.*, *52*, 1564-1571.
- Puppo, M. C., & Añón, M. C. (1998a). Effect of pH and Protein Concentration on Rheological Behavior of Acidic Soybean Protein Gels. *J. Agric. Food Chem.*, *46*, 3039-3046.
- Puppo, M. C., & Añón, M. C. (1998b). Structural Properties of Heat-Induced Soy Protein Gels As Affected by Ionic Strength and pH. *J. Agric. Food Chem.*, *46*, 3583-3589.
- Puppo, M. C., Beaumal, V., Chapleau, N., Speroni, F., de Lamballerie, M., Añón, M. C., & Anton, M. (2008). Physicochemical and rheological properties of soybean protein emulsions processed with a combined temperature/high-pressure treatment. *Food Hydrocoll.*, *22*(6), 1079-1089.
- Puppo, M. C., Lupano, C. E., & Añón, M. C. (1995). Gelation of Soybean Protein Isolates in Acidic Conditions. Effect of pH and Protein Concentration. *J. Agric. Food Chem.*, *43*, 2356-2361.
- Qi, M., Hettiarachchy, N. S., & Kalapathy, U. (1997). Solubility and Emulsifying Properties of Soy Protein Isolates Modified by Pancreatin. *J. Food Sci.*, *62*, 1110-1115.

- Ragab, D. D. M., Babiker, E. E., & Eltinay, A. H. (2004). Fractionation, solubility and functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) proteins as affected by pH and/or salt concentration. *Food Chem.*, *84*, 207-212.
- Rangel, A., Domont, G. B., Pedrosa, C., & Ferreira, S. T. (2003). Functional properties of purified vicilins from cowpea (*Vigna unguiculata*) and pea (*Pisum sativum*) and cowpea protein isolate. *J. Agric. Food Chem.*, *51*, 5792–5797.
- Remondetto, G. E., Paquin, P., & Suburade, M. (2002). Cold Gelation of β -lactoglobulin in the Presence of Iron. *J. Food Sci.*, *67*, 586-595.
- Renard, D., & Lefebvre, J. (1992). Gelation of globular proteins: effect of pH and ionic strength on the critical concentration for gel formation. A simple model and its application to β -lactoglobulin heat-induced gelation. *Int. J. Biol. Macromol.*, *14*, 287–291.
- Renkema, J. M. S., & Van Vliet, T. (2002). Heat-Induced Gel Formation by Soy Proteins at Neutral pH. *J. Agric. Food Chem.*, *50*, 1569-1573.
- Renkema, J. M. S., & Van Vliet, T. (2004). Concentration dependence of dynamic moduli of heat-induced soy protein gels. *Food Hydrocoll.*, *18*, 483-487.
- Renkema, J. M. S., Gruppen, H., & Van Vliet, T. (2002). Influence of pH and Ionic Strength on Heat-Induced Formation and Rheological Properties of Soy Protein Gels in Relation to Denaturation and Their Protein Compositions. *J. Agric. Food Chem.*, *50*, 6064-6071.
- Renkema, J. M. S., Knabben, J. H. M., & Van Vliet, T. (2001). Gel formation by β -conglycinin and glycinin and their mixtures. *Food Hydrocoll.*, *15*, 407-414.
- Rivas, N. R., Dench, J. E., & Caygill, J. C. (1981). Nitrogen extractability of sesame (*Sesamum indicum* L.) seed and the preparation of two protein isolates. *J. Sci. Food Agric.*, *32*, 565-571.
- Rodrigues, R. M., Martins, A. J., Ramos, O. L., Malcata, F. X., Texeira, J. A., Vicente, A. A., & Pereira, R. N. (2014). Influence of moderate electric fields on gelation of whey protein isolate. *Food Hydrocoll.*, 1-11.
- Rogers, N. (1999). High pressure processing: Its time for action. *Food Manuf.*, *74*, 34-36.
- Rose, R., Rose, C. L., Omi, S. K., Forry, K. F., Durall, D. M., & Bigg, W. L. (1991). Starch determination by perchloric acid vs. enzymes: evaluating the accuracy and precision of six colorimetric methods. *J. Agric. Food Chem.*, *39*, 2-11.
- Ross-Murphy, S. B. (1995a). Rheological characterization of gels. *J. Text. Stud.*, *26*, 391-400.
- Ross-Murphy, S. B. (1995b). Rheology of biopolymer solutions and gels. En *New Physicochemical techniques for the characterization of complex food systems*. Capítulo 4. Edición. Dickinson, E. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK.
- Ruan, K., Tian, S., Lange, R., & Balny, C. (2000). Pressure Effects on Tryptophan and Its Derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *269*, 681-686.

- Schwass, D. E., & Finley, J. W. (1984). Heat and alkaline damage to proteins: Racemization and lysinoalanine formation. *J. Agric. Food Chem.*, *32*, 1377–1382.
- Scilingo, A. A., & Añón, M. C. (2004). Characterization of Soybean Protein Isolates. The Effect of Calcium Presence. *JAOCS*, *81*, 63-69.
- Sefa-Dedeh, S., & Yiadom-Farkye, N. A. (1988). Some functional characteristics of cowpea (*Vigna unguiculata*), bambara beans (*Voandzeia subterranea*) and their products. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, *21*, 266–268.
- Shimada, K., & Cheftel, J. C. (1988). Texture Characteristics, Protein Solubility, and Sulfhydryl Group/Disulfide Bond Contents of Heat-Induced Gels of Whey Protein Isolate. *J. Agric. Food Chem.*, *36*, 1018-1025.
- Shimada, K., & Cheftel, J. C. (1989). Sulfhydryl Group/Disulfide Bond Interchange Reactions during Heat-Induced Gelation of Whey Protein Isolate. *J. Agric. Food Chem.*, *37*, 161-168.
- Souza e Silva, S. M., Maia, J. M., de Araujo, Z. B., & Freire Filho, F. R. (2002). Composição química de 45 genótipos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). EMBRAPA Meio-Norte, Comunicado Técnico, 149. ISSN 7646, Teresina, PI.
- Speroni Aguirre, F. J., Milesi, V., & Añón, M. C. (2007). Effect of extraction and precipitation conditions during soybean protein isolate production on the genistein series content. *JAOCS*, *84*, 305–314.
- Speroni, F., & Añón, M. C. (2013). Cold-set gelation of high pressure-treated soybean proteins. *Food Hydrocoll.*, *33*, 85-91.
- Speroni, F., Añón, M. C., & De Lamballerie, M. (2010a). Effects of calcium and high pressure on soybean proteins: A calorimetric study. *Food Res. Int.*, *43*, 1347-1355.
- Speroni, F., Beaumal, V., De Lamballerie, M., Anton, M., Añón, M. C., & Puppo, M. C. (2009). Gelation of soybean proteins induced by sequential high-pressure and thermal treatments. *Food Hydrocoll.*, *23*, 1433-1442.
- Speroni, F., Jung, S., & De Lamballerie, M. (2010b). Effects of Calcium and Pressure Treatment on Thermal Gelation of Soybean Protein. *J. Food Sci.*, *75*, 30-38.
- Steffe, J. F. 1996. Introduction to rheology. In J. F. Steffe (Ed.). *Rheological methods in food process engineering*. USA: Freeman Press. pp., 1-93.
- Sun, X. D., & Arntfield, S. D. (2010). Gelation properties of salt-extracted pea protein induced by heat treatment. *Food Res. Int.*, *43*, 509–515.
- Sun, X. D., & Arntfield, S. D. (2011). Gelation properties of salt-extracted pea protein isolate induced by heat treatment: Effect of heating and cooling rate. *Food Chem.*, *124*, 1011-1016.
- Tan, E. S., Ying-Yuan, N., & Gan, C. Y. (2014). A comparative study of physicochemical characteristics and functionalities of pinto bean protein isolate (PBPI) against the soybean protein isolate (SPI) after the extraction optimisation. *Food Chem.*, *152*, 447-455.

- Tang, C. H., & Ma, C. Y. (2009). Heat-induced modifications in the functional and structural properties of vicilin-rich protein isolate from kidney (*Phaseolus vulgaris* L.) bean. *Food Chem.*, *115*, 859-866.
- Tang, C. H., Sun, X., & Yin, S. W. (2009). Physicochemical, functional and structural properties of vicilin-rich protein isolates from three *Phaseolus* legumes: Effect of heat treatment. *Food Hydrocoll.*, *23*, 1771-1778.
- Tang, C.-H., Chen, L., & Foegeding, E. A. (2011). Mechanical and Water-Holding Properties and Microstructures of Soy Protein Isolate Emulsion Gels Induced by CaCl₂, Glucono- δ -lactone (GDL), and Transglutaminase: Influence of Thermal Treatments before and/or after Emulsification. *J. Agric. Food Chem.*, *59*, 4071-4077.
- Tombs, M. P. (1970). Alterations to proteins during processing and the formation of structure. En *Proteins as Human Foods*. Editorial R. A. Lawrie, Butterworth Publ., London.
- Totosaus, A., Montejano, J. G., Salazar, J. A., & Guerrero, I. (2002). A review of physical and chemical protein-gel induction. *Int. J. Food Sci. Technol.*, *37*, 589-601.
- Uruakpa, F. O., & Arntfield, S. D. (2005). The physico-chemical properties of commercial canola protein isolate-guar gum gels. *Int. J. Food Sci. Technol.*, *40*, 643-653.
- Utsumi, S. y Kinsella, J. E. (1985a). Forces involved in soy protein gelation: effects of various reagents on the formation, hardness and solubility of heat-induced gels made from 7S, 11S, and soy isolate. *J. Food Sci.*, *50*, 1278-1282.
- Utsumi, S. y Kinsella, J. E. (1985b). Structure-function relationship in food proteins: subunit interactions in heat-induced gelation of 7S, 11S, and soy isolate. *J. Agric. Food Chem.*, *33*, 297-303.
- Vaillancourt, R. E., & Weeden, N. F. (1992). Chloroplast DNA polymorphism suggests nigerian center of domestication for the cowpea, *Vigna unguiculata* (Leguminosae). *Am. J. Bot.*, *79*, 1194-1199.
- Van Vliet, T., Van Dijkl, H. J. M., Zoon, P., & Walstra, P. (1991). Relation between syneresis and rheological properties of particle gels. *Colloid. Polym. Sci.*, *269*, 620-627.
- Vasconcelos, I. M., Maia, F. M. M., Farias, D. F., Campello, C. C., Carvalho, A. F. U., De Azevedo Moreira, R., & de Oliveira, J. T. A. (2010). Protein fractions, amino acid composition and antinutritional constituents of high-yielding cowpea cultivars. *J. Food Compost. Anal.*, *23*, 54-60.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., del Mar Yust, M., & Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados protéicos. *Grasas Y Aceites*, *52*, 127-131.
- Vladimirov, Y. A., & Burstein, E. A. (1960). "Luminescence of Aromatic Amino Acids and Proteins". *Biofizika*, *5*, 385-392.

- Wagner, J. R. (2000). Propiedades Superficiales. En A. M. R. Pilosof & G. B. Bartholomai. Caracterización funcional y estructural de proteínas, Capítulo 3. Editorial Eudeba. CYTED. Buenos Aires, Argentina.
- Weber, G. (1992). Protein Interactions, Chapman and Hall, New York. 235-270.
- Wright, D. J., & Boulter, D. (1980). Differential Scanning Calorimetric Study of Meals and Constituents of Some Food. *J. Sci. Food Agric.*, *31*, 1231-1241.
- Yin, S. W., Tang, C. H., Wen, Q. B., Yang, X. Q., & Li, L. (2008). Functional properties and in vitro trypsin digestibility of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate: Effect of high-pressure treatment. *Food Chem.*, *110*, 938-945.

APÉNDICE I

Soluciones empleadas en SDS-PAGE

- **Solución de Acrilamida-Bisacrilamida:** 30,0% p/v Acrilamida, 0,8% p/v Bisacrilamida en agua destilada.
- **Buffer del gel separador:** 1,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, en agua destilada, pH 8,8.
- **Buffer del gel concentrador:** 0,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, en agua destilada, pH 6,8.
- **Solución de Persulfato de Amonio al 10% p/v,** en agua destilada.
- **N,N,N',N'-tetrametilendiamina**
- **Buffer de muestra:** 0,125 M Tris-HCl, 2% SDS, 50% Glicerol, 0,1% Azul de bromofenol, en agua destilada, pH 6,8.
- **Buffer de corrida:** 0,192 M Glicina, 0,025 M Tris-HCl, 0,1% SDS, en agua destilada, pH 8,3.