

Estabilidad de espumas formuladas con proteínas de soja tratadas a pH ácido

Abirached, C. ⁽¹⁾, Medrano, C. A. ⁽¹⁾, Panizzolo, L. A. ⁽¹⁾, Moyna, P. ⁽¹⁾, Añón, M. C. ⁽²⁾

⁽¹⁾Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay

⁽²⁾Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Contacto: abirached@fq.edu.uy

Recibido: 07/04/2010 - Aprobado: 04/11/2010

Resumen

Se estudió la influencia del tratamiento a pH ácido de aislados proteicos de soja sobre las propiedades espumantes mediante el análisis de las constantes cinéticas de desproporción y drenado y el relacionamiento de éstas con los parámetros de reología interfacial. Los aislados proteicos de soja fueron obtenidos a partir de harina desgrasada. Una porción se llevó a pH 8,0 y otra porción se trató a pH 2,0. De la porción a pH 2,0 una parte se dejó a este pH y otra parte se neutralizó a pH 8,0. Todas las porciones se liofilizaron. Para la identificación y caracterización estructural de las muestras se realizaron análisis de electroforesis desnaturante, calorimetría diferencial de barrido, solubilidad e hidrofobicidad superficial. Se obtuvieron espumas por el método de burbujeo de gas. Se determinó la velocidad inicial de pasaje de líquido a la espuma y el volumen máximo de líquido incorporado a la espuma. El proceso de desestabilización de las espumas formadas se analizó ajustando los datos obtenidos a una cinética de segundo orden bifásica. Se realizaron estudios de reología interfacial con un tensiómetro de gota. El tratamiento a pH ácido mejoró tanto la espumabilidad como la estabilidad de las espumas. La proporción de líquido drenado por escurrido gravitatorio fue significativamente superior al volumen drenado debido a la desproporción. El tratamiento a pH 2,0 redujo la desestabilización por desproporción de Ostwald, lo que sugiere la formación en la interfase de una película más cohesiva, que se confirma con los parámetros de reología interfacial.

Palabras clave: Drenado, desproporción de Ostwald.

Abstract

In this work the influence of the acid pH treatment of soy protein isolate on the foaming properties by analysis of the kinetic constants of disproportion and drainage and their relation with the interfacial rheology parameters was studied. Soy protein isolates were obtained from defatted flour. A portion was brought to pH 8.0, another portion was treated at pH 2.0. From the portion treated at pH 2.0 a portion was left at this pH and another was neutralized to pH 8.0. All portions were lyophilized. For the identification and structural characterization of the samples were performed denaturing electrophoresis analysis, differential scanning calorimetry, solubility and surface hydrophobicity. Foams were obtained by the method of gas bubbling. The initial rate of passage of liquid to foam and the maximum volume of fluid incorporated to the foam were determined. The process of destabilization of foams formed was analyzed by fitting the data to a biphasic second-order kinetics. Studies were performed with an interfacial rheology drop tensiometer. Acid pH treatment improved both the foam and foam stability. The proportion of liquid drained by gravity was significantly higher than the drained volume because of the disproportion. Treatment at pH 2.0 reduced the Ostwald disproportion destabilization, suggesting the formation at the interface of a more cohesive film, which is confirmed by the interfacial rheology parameters.

Keywords: Drainage, Ostwald ripening.

Introducción

En el presente, las proteínas de soja se usan cada vez más en la elaboración de productos alimenticios fabricados como emulsificantes, agentes espumantes, espesantes y agentes de absorción y retención de agua. Sin embargo, el óptimo uso de la proteína de soja en, por ejemplo, emulsiones y productos alimenticios tipo espuma requiere un conocimiento de sus propiedades de superficie bajo varias condiciones mucho mayor del que está actualmente disponible (Utsumi et al., 1997; Martín et al., 2002). Para estudiar las propiedades de superficie se analizan los parámetros viscoelásticos, módulo dilatacional superficial, E, y sus componentes elástica, Ed, y viscosa, Ev.

Las espumas son dispersiones de burbujas de aire en un medio

líquido que contiene un agente activo de superficie, también llamado agente espumante. Este agente activo de superficie tiende a situarse en la superficie, protegiendo del colapso de las burbujas. La composición y las propiedades de la capa adsorbida determinan la estabilidad y propiedades físicas resultantes de la espuma (Maldonado-Valderrama et al., 2007). El proceso de desestabilización de una espuma consiste en la tendencia de la fase gaseosa discontinua a formar una fase continua por aproximación y fusión de las burbujas, a fin de alcanzar un área superficial mínima (mínima energía libre). A este proceso se opone la película proteica superficial, que como barrera mecánica es más efectiva cuanto mayor son su viscoelasticidad y su rigidez. Los mecanismos de desestabilización de una espuma son: drenaje de líquido por efecto de la gravedad, desproporción o maduración

de Ostwald, por el que las burbujas grandes crecen a expensas de las pequeñas por difusión de gas a través de la lamela, y colapso de la espuma por ruptura de las lamelas. Todos estos mecanismos ocurren simultánea y sinérgicamente (Wagner, 2000). Se han realizado varios estudios de la cinética de desestabilización de espumas. Panizzolo (2005) plantea que existen dos procesos diferenciados de drenado de líquido de la espuma, uno debido al drenado de líquido propiamente dicho y otro a la desproporción de Ostwald. En base a ello planteó un modelo de segundo orden bifásico donde se determinan las constantes de velocidad y los volúmenes máximos drenados debido al drenado gravitacional y a la desproporción.

La viscosidad dilatacional de superficie es crucial para la capacidad de un sistema tensioactivo para formar una espuma estable. La viscosidad superficial disminuye las distorsiones mecánicas que de otro modo podrían causar una ruptura de las lamelas de las espumas (Koelsch y Motschmann, 2005). Por su parte, Georgieva et al. (2009) plantearon que la ruptura de la película es controlada por elasticidad dilatacional superficial y que la maduración de Ostwald es principalmente afectada por el espesor de la película entre las burbujas y la solubilidad del gas en el agua.

Después de la disolución en agua o a un pH ligeramente alcalino, las proteínas de soja pueden separarse en varias fracciones por cromatografía permeable de gel, electroforesis, ultracentrífuga, etcétera. Cuando se utiliza esta última técnica se separan cuatro fracciones cuyos coeficientes de sedimentación $S_{20,w}$ (unidades Svedberg, a 20 °C, en el agua) son respectivamente iguales a 2, 7, 11 y 15. Las globulinas glicinina (11S) y β -conglucina (7S) representan por sí solas más del 70% de las proteínas del grano de soja. La β -conglucina es una glicoproteína que contiene en torno de 5% de glúcidos (mannosa y N-acetil-glucosamina). Está constituida por tres subunidades α , α' y β , de carácter ácido (Cheftel, 1989). La glicinina es una proteína globular y se presenta como un hexámero. Las seis subunidades monoméricas tienen la estructura general AB, donde A representa un polipéptido ácido y B un polipéptido básico. Las cadenas A y B están unidas por un puente disulfuro. Dependiendo de la solubilidad, pH y fuerza iónica la glicinina (11S) se disocia en la forma 7S ((AB)₃) y/o en la forma 3S (AB). A pH 6.7 la glicinina está presente en las formas 3S, 7S y 11S en 0, 3 y 57%, respectivamente y a pH 3.0 en 70, 27 y 0%, respectivamente. Esto significa que a pH 3.0 una mezcla de las formas 3S y 7S está presente y a pH 6.7 está presente principalmente la forma 11S. Aunque tanto las formas 3S como 11S son capaces de formar una red en la interfase aire-agua, la red de 11S es menos rígida (fuerte). La diferencia en la rigidez reside en la estructura más compacta de la forma 11S y la ocurrencia de otros tipos de interacciones dentro de las moléculas. La forma 3S es más flexible debido a la alta repulsión electrostática dentro de la molécula. Por lo tanto, será más fácil de desplegar durante la adsorción en la interfase y tendrá más posibilidades de formar enlaces físicos y covalentes intermoleculares (Martin et al., 2002).

Cualquier cambio de pH, fuerza iónica, temperatura, composición del solvente, etcétera, en el entorno de una proteína nativa, obligará a la molécula a asumir una nueva estructura de equilibrio. Los cambios significativos en las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria sin ruptura de los enlaces peptídicos de la cadena son considerados como "desnaturalización". En algunos casos la desnaturalización de las proteínas es deseable. Las proteínas parcialmente desnaturalizadas son más digestibles y tienen mejores propiedades de formación de espuma y emulsión que las proteínas nativas (Damoradan, 2008).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia del tratamiento a pH ácido de aislados proteicos de soja sobre las propiedades espumantes, mediante el estudio de las constantes

cinéticas de desproporción y drenado y el relacionamiento de éstas con estudios de reología interfacial.

Materiales y Métodos

Obtención y tratamiento con pH de las proteínas de soja

El aislado proteico de soja en estado nativo (APSn) se obtuvo por solubilización acuosa de harina de soja desengrasada en medio alcalino (pH 8.0) y posterior precipitación a pH 4.5, dispersión del precipitado en medio alcalino (pH 8.0) y secado por liofilización (Petrucci y Añón, 1994). Con las proteínas nativas se preparó una dispersión de 15 mg/ml, se la llevó a pH 2.0 con HCl 6.0 N durante 1 hora y se liofilizó (APSt2). Con estas proteínas tratadas con pH ácido, se preparó una dispersión de 15 mg/ml, se la llevó a pH 8.0 con NaOH 5.0 N durante una hora y se liofilizó (APSt2-8).

Se determinó contenido de proteína por método de Lowry (Lowry et al., 1951) en cada etapa.

Identificación de las fracciones por electroforesis

Las corridas electroforéticas se realizaron en un equipo BIO-RAD MINI PROTEIN II CELL. Se llevó a cabo una electroforesis desnaturante con SDS en gradiente 7-15% de acrilamida, según lo descrito por Petrucci y Añón (1994). La corrida fue hecha a un voltaje constante de 90 V para dos geles de 1.0 mm de espesor. Se utilizó una unidad de electroforesis SE 640 Hoefer Scientific instruments. El peso molecular de las proteínas fue estimado mediante un patrón de pesos moleculares LMW Pharmacia consistente en seis proteínas de peso molecular 14.4, 20.1, 30.0, 45.0, 66.0 y 97.0 kDa.

Solubilidad

Se determinó la solubilidad de las diferentes muestras dispersándolas en solución de fosfato de sodio 10 mM pH 8.0 al 0.1% p/v durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 10.000 xg durante 10 minutos a 4 °C. El contenido de proteína en el sobrenadante se determinó utilizando el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

Hidrofobicidad superficial

Los valores de hidrofobicidad aromática superficial (H_A) de cada muestra fueron determinados por medio de la sonda fluorescente ANS (ácido 8-anilino 1 naftalen-sulfónico) de acuerdo al método de Hayakawa y Nakai (1985). La hidrofobicidad superficial se determinó como la pendiente inicial de la curva de intensidad de fluorescencia relativa porcentual versus la concentración de proteína según Kato y Nakai (1980).

Estabilidad térmica y grado de conformación nativa mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se determinó la temperatura, entalpía de desnaturalización (ΔH_d), utilizando un Calorímetro de Barrido Diferencial - DSC Serie Q100 TA Instruments con software Universal Analysis 2000. Las muestras analizadas fueron dispersiones de APSn, APSt2, APSt2-8 previamente descriptos. Se utilizaron cápsulas de aluminio herméticas en las que se colocaron aproximadamente 20 mg de muestra. Como referencia se

Conclusiones

El tratamiento con pH ácido mejora la capacidad espumante y la estabilidad de las espumas del aislado como efecto de desnaturalización de las proteínas y consecuente aumento en la hidrofobicidad superficial. La proporción de líquido drenado por escurrido gravitatorio fue significativamente superior al volumen drenado debido a la desproporción. El tratamiento ácido redujo la desestabilización por desproporción de Ostwald, lo cual sugiere la formación en la interfase de una película más resistente. APSt2 a pH 8,0 forma una película con un mayor componente viscoso, mientras que a pH 2,5 forma una película más elástica. Ambas condiciones favorecen la resistencia de la película a las deformaciones.

Reconocimientos

Los autores agradecen a LATU la beca otorgada por medio del convenio LATU-Facultad de Química, el soporte financiero del Programa de Desarrollo Tecnológico (PDT) del Ministerio de Educación y Cultura y el Plan de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Uruguay.

Referencias

- CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. Proteínas alimentarias: bioquímica, propiedades funcionales, valor nutritivo, modificaciones químicas. Zaragoza: Acribia, 1989.
- DAMODARAN, S. Amino acids, peptides, and proteins. En: FENNEMA, O. R. *Química de los alimentos*, 3ª ed. Zaragoza: Acribia, 2008.
- GEORGIEVA, D.; CAGNA, A.; LANGEVIN, D. Link between surface elasticity and foam stability. En: *Soft Matter*, 2009, 5(10):2063-2071.
- HAYAKAWA, S.; NAKAI, S. Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. En: *Journal of Food Science*, 1985, 50(2):486-491.
- KATO, A.; NAKAI, S. Hydrophobicity determined by fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. En: *Biochimica et Biophysica Acta*, 1980, 624(1):13-20.
- KOELSCH, P.; MOTSCHMANN, H. Relating foam lamella stability and surface dilational rheology. En: *Langmuir*, 2005, 21(14):6265-6269.
- LOISEL, W.; GUÉGUEN, J.; POPINEAU, Y. A new apparatus for analyzing foaming properties of proteins. En: SCHWENKE, K. D.; MOTHES, R. VCH. *Food proteins, structure and functionality*. Germany: Weinheim, 1993. pp. 320-323.
- LOWRY, Oliver H.; ROSEBROUGH, Nira J.; FARR Lewis, A.; RANDALL, Rose J. Protein measurement with the folin phenol reagent. En: *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193(1):265-275.
- MALDONADO-VALDERRAMA, J.; MARTÍN-MOLINA, A.; MARTÍN-RODRIGUEZ, A.; CABRERIZO-VÍLCHEZ, M. A.; GÁLVEZ-RUIZ, M. J.; LANGEVIN, D. Surface properties and foam stability of protein/surfactant mixtures: theory and experiment. En: *Journal of Physical Chemistry C*, 2007, 111(6):2715-2723.
- MARTÍN, A. H.; BOS, M. A.; VAN VLIET, T. Interfacial rheological properties and conformational aspects of soy glycinin at the air-water interface. En: *Food Hydrocolloids*, 2002, 16(1):63-71.
- PANIZZOLO, L. A. *Modificación de proteínas por vía enzimática. Análisis de la relación estructura-funcionalidad de los productos de hidrólisis*. Montevideo: UDELAR, Facultad de Química, 2005. (Tesis de Doctorado).
- PETRUCCELLI, S.; AÑÓN, M. C. The relationship between the method of preparation and the structural and functional properties of soy protein isolates. Part I: Structural and hydration properties. En: *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1994, 42:2161-2169.
- PUPPO, M. C. *Propiedades gelificantes de las proteínas de soja a pH ácido*. La Plata: Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, 1997. (Tesis Doctoral).
- STUBENRAUCH, C.; MILLER, R. Stability of foam films and surface rheology: an oscillating bubble study at low frequencies. En: *Journal of Physical Chemistry B*, 2004, 108(20):6412-6421.
- UTSUMI, S.; MATSUMURA, Y.; MORI, T. Structure-function relationships of soy proteins. En: DAMORADAN, S.; PARAF, A. *Food proteins and their applications*. New York: Dekker, 1997.
- WAGNER, J. R.; SORGININI, D. A.; AÑÓN, M. C. Thermal and electrophoretic behavior, hydrophobicity and some functional properties of acid-treated soy isolates. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44:1881-1889.
- WAGNER, J. R. Propiedades superficiales. En: BARTHOLOMAI, W.; PILOSOFF, A. M. R. eds. *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. Buenos Aires: EUDEBA, 2000.