



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



Universidad
Nacional
de Quilmes

Moscoso Ospina, Yeisson Andrés

Modificaciones tecnológicas de okara de soja. Aplicaciones en el área alimentaria



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

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

Cita recomendada:

Moscoso Ospina, Y. A. (2026). *Modificaciones tecnológicas de okara de soja. Aplicaciones en el área alimentaria. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes* <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/6161>

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

**AcX]ZVW]cbYg`hWbc`Q]]WUg`XY`c_UfU`XY`gc`U`5`d`]WU]cbYg`Yb`Y`
zfYUU]a`YbHf]U`**

TESIS DOCTORAL`

MY]ggcb`5`bXf`fg`A`cgWt`gc`Cgd]bU`

yeissonandresm@gmail.com`

F`Ygi`a`Yb`

El término okara hace referencia al residuo insoluble obtenido luego de filtrar la lechada de soja. Particularmente, en esta investigación, nos referimos al okara de soja cuando hablamos del residuo obtenido luego de un proceso de extracción alcalina sobre copos desgrasados de dicho grano, empleando adicionalmente un proceso físico (ultrasonido de alta frecuencia) aplicado antes o después de la extracción alcalina dando como resultado las fracciones denominadas OK, S-OK y OK-S. Posteriormente, los polisacáridos del okara pueden separarse en solubles e insolubles bajo condiciones de extracción ácida, alta temperaturas y presión elevadas (pH 3-3,5, 120°C, 1atm en barómetro). Este proceso permite obtener una fracción soluble, comercializada como SSPS (*soluble soybean polysaccharides*), y una fracción insolubledenominada como ISPS (*insoluble soybean polysaccharides*). Actualmente, solo existe un limitado número de fuentes de literatura específica sobre la mencionada fracción insoluble, siendo una de las primeras en el tema la generada por el grupo de investigación donde se ha realizado el presente trabajo. Siguiendo la nomenclatura utilizada para los okaras, el proceso de extracción ácida permitió la obtención de las fracciones ISPS, S-ISPS e ISPS-S. En el presente trabajo, además de la obtención y caracterización de las fracciones de okara y de ISPS, se propuso el análisis de sus propiedades emulsificantes en sistemas O/W, preparadas a pH ácido, con y sin la adición de sales.

En el Capítulo I, se presenta una introducción general acerca de la composición del poroto de soja, las diferentes transformaciones industriales de importancia, los procesos de fraccionamiento de diferentes subproductos de la industria, los procesos de homogeneización destinados al desarrollo de emulsiones alimentarias y los diferentes equipos utilizados en este tipo de proceso, y los diferentes mecanismos de desestabilización de dichas emulsiones.

En el Capítulo II, se detallan los procedimientos de obtención y caracterización fisicoquímica (proteína bruta, electroforesis, fibra dietaria total, azúcares neutros, cenizas y humedad) para las fracciones de okara e ISPS. Además, se analizaron los perfiles espectrales FTIR y los cambios morfológicos en sus fibras, generados como producto del proceso de sonicación (S-OK y S-ISPS). El fenómeno de cavitación produjo una ruptura de las estructuras de los polisacáridos disminuyendo considerablemente el tamaño de partícula de las fracciones de los okara y aumentando su área superficial. Por otro lado, el tratamiento de sonicación aplicado previamente al proceso de extracción alcalina, también pudo generar la formación de agregados proteicos de elevado peso molecular.

En el Capítulo III, se muestran las propiedades de interface (solubilidad proteica, tensión interfacial, reología interfacial y potencial ζ) de las diferentes fracciones de okara e ISPS. Estas propiedades se evaluaron a diferentes condiciones de pH (3,0 y 4,5) con y sin el agregado de sales (NaCl y CaCl₂).

Se observó que la muestra S-OK fue la única que presentó una curva de solubilidad en función del pH tipo U, presentando la menor solubilidad en el punto isoeléctrico de las proteínas de reserva (pI ~4,5). S-OK mostró una solubilidad asociada, principalmente, al elevado contenido de estructuras proteicas relacionadas con la glicinina (11S) que precipitaron formando agregados reversibles a través de interacciones no covalentes durante el proceso de sonicación. Las curvas de las fracciones OK y OK-S, demostraron la presencia de proteínas prácticamente insolubles. Por otro lado, las fracciones ISPS presentaron mayor solubilidad que las fracciones de okara correspondientes. Esto estaría ligado a diversos factores como la hidrólisis proteica y/o a la desamidación de dichas estructuras bajo condiciones ácidas fuertes, elevada temperatura y presión.

Respecto al análisis de la actividad interfacial, todas las fracciones obtenidas permitieron una reducción de este parámetro. Particularmente, las dispersiones de ISPS, a bajas concentraciones, presentaron una alta capacidad para aumentar su actividad interfacial. Respecto a las fracciones de okara, dichas dispersiones, también permitieron una reducción importante en los valores de tensión superficial en el equilibrio.

Por último, las dispersiones S-OK y S-ISPS promovieron la formación de un film más resistente (valores η^* más altos) con respecto a las otras fracciones. Este aumento de η^* podría atribuirse a una buena actividad emulsionante, debido a un mayor contenido de proteínas y/o a la acción de los polisacáridos que modifican la estructura de la película al interactuar directamente en la interfaz (mediante estructuras glicoproteicas) o en la formación de capas externas.

En el Capítulo IV, se describe el estudio de las propiedades emulsificantes de las diferentes fracciones de okara e ISPS como agentes emulsificantes en sistemas O/W. Esta propiedad fue evaluada a través de la caracterización óptica de las mismas mediante un analizador

vertical de barrido (Turbiscan), un microscopio óptico, un analizador de tamaño de partículas y un reómetro oscilatorio.

Las emulsiones finas formuladas con la fracción S-OK a pH 3,0, exhibieron tamaños de gotas $D[4,3]$ entre 10,7 a 12,2 μm . En cambio, a pH 4,5, todas las emulsiones formuladas con las fracciones de S-OK mostraron tamaños de gotas superiores a 50 μm . El incremento del pH modificaría claramente el comportamiento interfacial de las proteínas, al igual que en las emulsiones gruesas el pl limitaría la actividad de las proteínas, afectando la capacidad emulsificante y aumentando el tamaño de partícula inicial. Adicionalmente, el agregado de sales no modificó significativamente el tamaño de partícula inicial, sin embargo, esta adición generó una mayor estabilidad del tamaño de partícula en el tiempo a pH 3,0. En condiciones de pH 4,5, la adición de sales permitió disminuir el tamaño de partícula inicial. Probablemente, las interacciones entre este emulsionante y las sales adicionadas podrían tener un efecto importante en la generación de un film interfacial más resistente permitiendo la interacción a nivel interfacial entre las estructuras proteicas y los polisacáridos, y manteniendo una estructura de flóculos más compacta, la cual se observó mediante el comportamiento microscópico y reológico de los sistema.

Por otro lado, todas las emulsiones formuladas con fracciones de polisacáridos insolubles de soja (ISPS, S-ISPS, ISPS-S) mostraron valores iniciales $D[4,3]$ sin variaciones considerables a lo largo del tiempo. S-ISPS generó las emulsiones con menores tamaños de gota durante su almacenamiento, con grados de floculación mayores al 40% a ambos pH. A diferencia de la fracción de okara, las fracciones ISPS no se vieron afectadas en forma importante por la influencia del pH. En este tipo de fracciones, las proteínas que brindan la actividad emulsificante no estarían relacionadas a las proteínas de reserva de la soja, y por ello, no se ven afectadas en condiciones de pH cercanas a las del punto isoeléctrico. Por otra parte, el agregado de sales tampoco tuvo un efecto significativo sobre el proceso de desestabilización global. Estos resultados resaltan las condiciones de los polisacáridos insolubles de soja para ser incorporados en la formulación de emulsiones alimenticias. También, la posibilidad de la inclusión de sales de sodio y calcio en formulaciones para el desarrollo de emulsiones ácidas.



Universidad
Nacional
de Quilmes



MODIFICACIONES
TECNOLÓGICAS DE OKARA DE
SOJA. APLICACIONES EN EL
ÁREA ALIMENTARIA

TESIS DOCTORAL
ING. YEISSON ANDRES MOSCOSO OSPINA

DIRECTOR: DR. DARIO MARCELINO CABEZAS
CO-DIRECTORA: DRA. MARIA CECILIA PORFIRI

2023



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

TESIS DOCTORAL

Modificaciones tecnológicas de okara de soja. Aplicaciones en el área alimentaria

Ing. Yeisson Andrés Moscoso Ospina.

Director: Dr. Dario Marcelino Cabezas.

Codirectora: Dra. María Cecilia Porfiri.

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



Bernal, Argentina, 2023

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a mi director, el Dr. Dario Cabezas por su valiosa contribución en mi formación académica, por su apoyo personal y profesional, por guiarme durante el trabajo experimental y su gran dedicación y acompañamiento durante el análisis de resultados, escritura de este trabajo, su gran paciencia y perseverancia en todos los momentos más desde el inicio de este proceso.

A mi codirectora, la Dra. María Cecilia Porfiri quiero expresarle todo mi agradecimiento por su gran aporte y dedicación durante el análisis de resultados y la escritura de esta tesis.

A mi familia por guiarme y apoyarme durante gran parte de mi vida. A Micaela le agradezco por ser mi compañera, mi ayuda incondicional en todo momento. Por sus palabras de aliento haciendo este proceso más fácil de llevar.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por otorgarme la beca que permitió realizar mi formación. A la Universidad Nacional de Quilmes, por la formación académica que me proporcionó. A mis compañeros y amigos del LIFTA: Darío, Cecilia, Gonzalo, Andrés, Sebastian, Mariana, Paula, Anahí y Daniela, por su valioso compañerismo.

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

Revistas periódicas

- **Y.A. Moscoso Ospina**; M.C. Porfiri; D.M. Cabezas. Soybean okara: effect of ultrasound on compositional and emulsifying properties. *International Journal of Food Science & Technology* 2022, 57(7), 3914–3923 (2022). <https://doi.org/10.1111/ijfs.15470>.
- **Y.A. Moscoso Ospina**; M.E. Lionello; L. Garófalo; D.M. Cabezas; M.J. Correa. Effect of ultrasonic treatment on soybean okara to be used as a gluten-free bread improver. *International Journal of Food Science and Technology*, 2023 (en prensa). <https://doi.org/10.1111/ijfs.16484>

Congresos nacionales e internacionales

- V.E. Ragonese; **Y.A. Moscoso Ospina**; D.M. Cabezas; E.J. Kakisu. Estudio de la capacidad emulsificante del okara de quinoa tratado con ultrasonido de alta energía. *Proceedings VIII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, Córdoba, Argentina, 4-6 de Octubre de 2022. Resumen – Poster.
- **Y.A. Moscoso Ospina**; M.C. Porfiri; D.M. Cabezas. “Polisacáridos insolubles de soja como agentes emulsificantes en emulsiones acidas O/W” *Proceedings VIII*

Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Argentina, 4-6 de Octubre de 2022. Resumen – Poster.

- D.M. Cabezas; J.J. Burbano Moreano; **Y.A. Moscoso Ospina**; M.J. Correa. Soybean okara: effect of ultrasonic treatment in its action as bread improver. 10° Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos (INNOVA 2021), Montevideo, Uruguay, 27 de Septiembre al 1 de Octubre de 2021. Resumen – Poster + Video.
- **Y.A. Moscoso Ospina**; M.C. Porfiri; D.M. Cabezas. Effect of ultrasound on compositional and emulsifying properties of soybean okara. 2021 AOCS Annual Meeting & Expo, online, 3-14 de Mayo de 2021. Presentación oral (Dr. Cabezas).
- M.J. Correa; M. Di Franco; R. Firmapaz; A. Di Menna; J.J. Burbano Moreano; **Y.A. Moscoso Ospina**; D.M. Cabezas. Efecto de la sonicación sobre las propiedades funcionales del okara de nuez en la elaboración de emulsiones O/W y panificados libres de gluten. III Congreso Iberoamericano de Ingeniería de los Alimentos, Montevideo, Uruguay, 18-20 de noviembre de 2020. Resumen – Seleccionado para presentarse en forma oral.
- **Y.A. Moscoso Ospina**; M. Lionelo; L. Garofalo; M.J. Correa; D.M. Cabezas. Aplicaciones Tecnológicas del okara de soja en la producción de alimentos panificados libres de gluten. Trabajo Extendido. XXVII Jornadas de Jovens Pesquisadores AUGM, Sao Carlos, Brasil (2019).

- M.J. Correa; M. Di Franco; A. Di Menna; J. Burbano Moreano; **Y.A. Moscoso Ospina**; D.M. Cabezas. Utilización de okara de nuez en la elaboración de panificados libres de gluten. Resumen. IX Simposio de Química Aplicada (IX SIQUIA) y I Congreso Internacional de Nanoquímica, Nanofísica y Nanomedicina (I CINNN). Universidad del Quindío, Armenia, Colombia (2019).
- **Y.A. Moscoso Ospina**; M.C. Porfiri; D.M. Cabezas. Efecto del ultrasonido sobre las propiedades interfaciales del okara de soja. Resumen. IX Simposio de Química Aplicada (IX SIQUIA) y I Congreso Internacional de Nanoquímica, Nanofísica y Nanomedicina (I CINNN). Universidad del Quindío, Armenia, Colombia (2019).
- **Y.A. Moscoso Ospina**; C.C. Villa Zabala; D.M. Cabezas. Aplicación de Okara de soja como agente emulsificante en emulsiones acidas. Resumen. Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas. San Rafael, Argentina (2018)
- M.J. Correa; M. Lionelo; **Y.A. Moscoso Ospina**; D.M. Cabezas. Okara de soja como mejorador en panificados libres de gluten: efecto de la sonicación de sus dispersiones antes del proceso de batido. Resumen. Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas. San Rafael, Argentina (2018).
- M.J. Correa; M. Lionelo; L. Garofalo; **Y.A. Moscoso Ospina**; D.M. Cabezas; Modificaciones tecnológicas sobre okara de soja para su aplicación como mejorador en panificados libres de gluten. Resumen. VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Córdoba, Argentina (2018).
- **Y.A. Moscoso Ospina**; M.C. Porfiri; D.M. Cabezas. Efecto del agregado de sales en la estabilidad de emulsiones ácidas (O/W) formuladas con okara de soja. Resumen.

Congreso. VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

Córdoba, Argentina (2018).

INDICE

Capítulo 1

Introducción general

1.1	Soja	1
1.1.1	Composición química de la soja	2
1.1.2	Proteínas del grano de soja	3
1.1.2.1	Clasificación basada en su función biológica	3
1.1.2.1.1	Proteínas metabólicas.....	3
1.1.2.1.2	Proteínas de reserva	3
1.1.2.2	Clasificación basada en el patrón de solubilidad	4
1.1.2.2.1	Albúminas	4
1.1.2.2.2	Globulinas	4
1.1.2.3	Clasificación basada en el coeficiente de sedimentación	5
1.1.2.3.1	Glicinina y conglucina.....	6
1.1.2.3.2	Inhibidores de tripsina.....	7
1.1.2.3.3	Lectina.....	8
1.1.3	Lípidos del grano de soja	9
1.1.3.1	Triglicéridos.....	10
1.1.3.2	Fosfolípidos.....	10
1.1.4	Carbohidratos del grano de soja.....	11
1.1.4.1	Carbohidratos solubles.....	12
1.1.4.2	Carbohidratos insolubles.....	12
1.2	Usos del grano de soja	13
1.3	Subproductos de la industria de la soja.....	13
1.3.1	Harina desgrasada de soja.....	14
1.3.2	Okara de soja.....	15
1.3.2.1	Polisacáridos insolubles de soja (ISPS)	17
1.3.3	Modificación tecnológica de okara de soja mediante ultrasonido	17
1.4	Propiedades funcionales de los biopolímeros	19
1.4.1	Los polisacáridos y su rol como biopolímeros tecnofuncionales	20
1.4.2	Las proteínas y su rol como biopolímeros tecnofuncionales	21
1.5	Estudio de las propiedades emulsificantes.....	22
1.5.1	Emulsiones.....	22
1.5.2	Clasificación o tipo de emulsiones alimentarias.....	24
1.5.3	Tipos de emulsificantes.....	25
1.5.3.1	Emulsionantes proteicos	27

1.5.3.2	Emulsionantes de polisacáridos	27
1.5.3.3	Complejos de proteínas y polisacáridos como emulsionantes	29
1.5.4	La interacción proteína-polisacárido.....	30
1.5.5	Importancia de las emulsiones en el área de los alimentos.....	31
1.5.6	Homogenización o formación de emulsiones	32
1.5.6.1	Homogeneizador de alta presión.....	33
1.5.6.1.1	Homogeneización ultrasónica.....	35
1.5.6.1.2	Microfluidizadores	37
1.5.6.2	Aplicaciones de baja intensidad.....	38
1.5.7	Mecanismos físicos de desestabilización de emulsiones	39
1.5.7.1	Separación gravitacional.....	39
1.5.7.2	Floculación.....	41
1.5.7.3	Coalescencia	42
1.5.7.3.1	Coalescencia parcial.....	43
1.5.7.4	Inversión de fases.....	45
1.5.7.5	Maduración de Ostwald	46
1.5.8	Distribución de tamaño de partículas o gotas	48
1.5.9	Evaluación de la estabilidad de una emulsión por dispersión múltiple de luz..	52
1.6	Objetivos	56
1.6.1	Objetivo general.....	56
1.6.2	Objetivos específicos	56

Capítulo 2.....		
Obtención, caracterización y propiedades funcionales de fracciones derivadas de la harina de soja desgrasada (okara y polisacáridos insolubles de soja)		
2.2	Materiales y métodos	59
2.2.1	Materiales.....	59
2.2.1.1	Harina desgrasada de soja.....	59
2.2.2	Extracción de okara.....	60
2.2.2.1	Extracción de polisacáridos insolubles de soja (ISPS)	60
2.2.2.2	Rendimiento de extracción	64
2.3	Caracterización fisicoquímica.....	64
2.3.1	Determinación de humedad	64
2.3.2	Determinación del contenido de cenizas.....	65
2.3.3	Determinación del contenido de proteínas.....	65
2.3.4	Electroforesis	66
2.3.4.1	Reactivos.....	67
2.3.4.2	Preparación de los geles.....	68
2.3.4.3	Preparación de las muestras	69
2.3.4.4	Condiciones de corrida, coloración, decoloración y revelado de los geles	69
2.3.4.5	Pruebas adicionales de disociación proteica para fracciones ISPS.....	70
2.3.5	Determinación de fibra dietaria total	70
2.3.6	Determinación de azúcares componentes neutros	71
2.3.7	Espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR)	72

2.3.8	Morfología mediante microscopía electrónica.....	72
2.3.9	Análisis estadístico.....	73
2.4	Resultados y discusión.....	73
2.4.1	Rendimiento y composición fisicoquímica de muestras de okara e ISPS	73
2.4.2	Electroforesis de okara en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	77
2.4.2.1	Electroforesis de ISPS en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	79
2.4.3	Análisis de azúcares neutros	81
2.4.4	Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)	84
2.4.5	Morfología	87
2.5	Conclusiones parciales.....	90

Capítulo 3.....		
Propiedades de interfase		
3.1	Introducción	93
3.1.1	Coloide.....	93
3.1.2	Solubilidad proteica	95
3.1.3	Tensiones superficiales e interfaciales.....	96
3.1.4	Reología interfacial.....	98
3.1.5	Potencial- ζ	98
3.2	Materiales y métodos	99
3.2.2	Solubilidad proteica	99
3.2.3	Potencial zeta- ζ	102
3.2.4	Reología interfacial.....	103
3.2.5	Determinación de la tensión interfacial	104
3.3	Resultados y discusión.....	106
3.3.1	Dependencia de la solubilidad proteica con el pH.....	106
3.3.2	Dependencia de la presión y la tensión interfacial con el pH.....	109
3.3.3	Dependencia del potencial- ζ con el pH	113
3.3.4	Reología interfacial.....	115
3.4	Conclusiones parciales.....	117

Capítulo 4.....		
Formulación y estabilización de emulsiones O/W		
4.1	Emulsiones.....	120
4.1.1	Tipo de emulsiones	121
4.1.2	Factores que afectan la estabilidad de la emulsión	121
4.1.3	Formación	123
4.1.4	Caracterización y Propiedades de Coloides y Emulsiones	124
4.1.4.1	Tamaño de partícula.....	124
4.1.4.2	Estabilidad.....	125
4.1.4.3	Reología	126
4.2	Materiales y métodos	127

4.2.1	Preparación de las emulsiones O/W	127
4.2.1.1	Emulsiones gruesas	127
4.2.1.2	Emulsiones finas	128
4.2.2	Distribución de tamaño de partícula (DTP)	128
4.2.3	Cinética de cremado.....	129
4.2.3.1	Evaluación de la estabilidad global en condiciones estacionarias por dispersión multiple de luz.....	130
4.2.4	Comportamiento de flujo	131
4.2.4.1	Reología oscilatoria	132
4.2.5	Microscopia óptica.....	132
4.2.5.1	Evaluación de la microestructura.....	133
4.3	Resultados y discusión.....	133
4.3.1	Emulsiones gruesas de okara	133
4.3.1.1	Distribución de tamaño de partícula y microestructura de emulsiones	133
4.3.1.2	Análisis de la estabilidad frente al proceso de cremado	138
4.3.2	Emulsiones finas de S-OK.....	142
4.3.2.1	Distribución de tamaño de partícula y microestructura de emulsiones	142
4.3.2.2	Estabilidad global de las emulsiones de S-OK	144
4.3.2.3	Reologia oscilatoria de S-OK	146
4.3.3	Emulsiones finas de fracciones ISPS	148
4.3.3.2	Estabilidad global de las emulsiones ISPS	153
4.3.3.3	Reologia oscilatoria de emulsiones ISPS.....	156
4.3.3.4	Comportamiento de flujo de emulsiones S-OK e ISPS	157
4.4	Conclusiones parciales.....	161
Conclusiones finales.....		165
Referencias bibliograficas.....		169
Anexos.....		185

LISTADO DE FIGURAS

- 1.1 Diagrama de flujo general para la producción de subproductos de soja
- 1.2 Microscopía óptica de una emulsión aceite en agua O/W estabilizada con okara de soja al 4% m/m.
- 1.3 Representación gráfica de diferentes tipos de emulsiones
- 1.4 Representación esquemática de dispositivos mecánicos que se pueden usar para producir emulsiones utilizando el enfoque de alta energía
- 1.5 Dependencia del tiempo de la cinética de cremado en emulsiones.
- 1.6 Coalescencia de las gotas de una emulsión
- 1.7 Coalescencia parcial
- 1.8 Inversión de fases
- 1.9 Maduración de Ostwald
- 1.10 Distribuciones de tamaño de partícula para una emulsión aceite en agua (O/W)
- 2.1 Diagrama de obtención de las diferentes fracciones de okara
- 2.2 Diagrama de obtención de las diferentes fracciones de ISPS
- 2.3 Composición proteica de muestras de okara de soja (OK, S-OK y OK-S) analizadas en condiciones no reductoras y reductoras (5% de β -ME) (SDS-PAGE)
- 2.4 Composición proteica de muestras de polisacáridos insolubles de soja (ISPS, S-ISPS y ISPS-S) analizadas en condiciones no reductoras y reductoras (5% de β -ME) (SDS-PAGE)
- 2.5 Espectros de FTIR de diferentes fracciones de okara de soja
- 2.6 Espectros de FTIR de diferentes fracciones de polisacáridos insolubles de soja
- 2.7 Microscopía electrónica de barrido de las diferentes fracciones de okara de soja, con aumentos de 1000X, 2500X y 5000X.
- 2.8 Microscopía electrónica de barrido de las diferentes fracciones de polisacáridos insolubles de soja, con aumentos de 500X, 1000X y 2500X.
- 3.1 Recta de calibración para la determinación de proteína por el método de Markwell et al. (1978).
- 3.2 Representación de una celda capilar para la determinación de potencial- ζ
- 3.3 Representación gráfica de la geometría de anillo Du Noüy en la interfase aceite/agua para la determinación de la tensión interfacial de equilibrio y de la reología interfacial
- 3.4 Dependencia del pH en la solubilidad de las proteínas presentes en las muestras de okara de soja (OK, S-OK y OK-S).
- 3.5 Dependencia del pH en la solubilidad de la proteína para muestras de ISPS, S-ISPS e ISPS-S
- 3.6 Dependencia de la tensión y la presión interfacial en el equilibrio para muestras de okara
- 3.7 Dependencia de la tensión y la presión interfacial en el equilibrio para muestras

ISPS

- 3.8 Dependencia del potencial zeta ($-\zeta$) con el pH para muestras de okara e ISPS
- 3.9 Viscosidad compleja [η^*] en el tiempo para muestras de okara (4,0% m/m) e ISPS (2% m/m) a PH 3,0 y 4,5
- 4.1 Distribuciones de tamaño de partícula y microestructura de emulsiones gruesas O/W preparadas con dispersiones acuosas (4,0% m/m) fracciones de okara a pH 3,0
- 4.2 Distribuciones de tamaño de partícula y microestructura de emulsiones gruesas O/W preparadas con dispersiones acuosas (4,0% m/m) fracciones de okara a pH 4,5
- 4.3 Cinética de cremado (%FA) en el tiempo, con y sin el agregado de sales (NaCl y CaCl₂, 20mM) para muestras de okara (2 y 4% m/m)
- 4.4 Micrografía de emulsiones finas O/W mostradas en el día 28 (aumento: 40X)
- 4.5 Perfiles de Backscattering y el índice de estabilidad de Turbiscan en emulsiones finas O/W de fracción S-OK (4,0% m/m)
- 4.6 Reogramas en emulsiones finas O/W de fracciones S-OK (4,0% m/m)
- 4.7 Distribuciones de tamaño de partícula de emulsiones finas O/W preparadas con dispersiones acuosas (2,0% m/m) fracciones de polisacáridos insolubles de soja
- 4.8 Micrografía de emulsiones finas O/W mostradas en el día 28 (aumento: 100X)
- 4.9 Perfiles Backscattering (BS% vs. longitud del tubo mm) medición de emulsión en días) en emulsiones finas O/W de fracciones ISPS (2,0% m/m)
- 4.10 Reogramas (G^* vs frecuencia Rad/s) medición de las emulsiones en tiempo) en emulsiones finas O/W de fracciones ISPS (2,0% m/m)
- 4.11 Reogramas (viscosidad Pa*s vs shear rate s^{-1}) medición de las emulsiones en tiempo) en emulsiones finas O/W de fracciones ISPS (2,0% m/m)
- 4.12 Reogramas viscosidad vs shear rate, en emulsiones finas O/W de fracciones okara (4,0% m/m)

LISTADO DE TABLAS

- 1.1 Composición química del grano de soja
- 2.1 Rendimiento de extracción y análisis composicional de la harina de soja y de las diferentes fracciones de okara de soja
- 2.2 Rendimiento de extracción y análisis composicional de diversas muestras de polisacáridos insolubles de soja (ISPS)
- 2.3 Contenido de azúcares componentes neutros para las fracciones de okara e ISPS
- 4.1 Diámetros promedios de De Brouckere D[4,3] obtenidos a partir de las distribuciones de tamaño de partícula de emulsiones gruesas O/W 4% m/ma pH 3,0
- 4.2 Diámetros promedios de De Brouckere D[4,3] obtenidos a partir de las distribuciones de tamaño de partícula de emulsiones gruesas O/W 4% m/ma pH 4,5
- 4.3 Diámetros promedios de De Brouckere D[4,3] obtenidos a partir de las distribuciones de tamaño de partícula de emulsiones finas O/W 4% m/m.
- 4.4 Diámetros promedios de De Brouckere D[4,3] obtenidos a partir de las distribuciones de tamaño de partícula de emulsiones finas O/W 2% m/m a pH 3,0 y 4,5
- 4.5 Grado de floculación obtenidos a partir de las distribuciones de tamaño de partícula de emulsiones finas O/W 2% m/m a pH 3,0 y 4,5.
- 4.6 Índice de estabilidad de Turbiscan obtenidos a partir de emulsiones finas O/W formuladas con fracciones ISPS (2% m/m) a pH 3,0 y 4,5

LISTADO DE ECUACIONES

- 1.1 Ecuación de volumen de fase dispersa (φ)
- 1.2 Ecuación de fracción másica de la fase dispersa (φ_m)
- 1.3 Ecuación de fracción másica de la fase dispersa (φ_m)
- 1.4 Ecuación de funciones de distribución en volumen $F_v(D_i)$
- 1.5 Ecuación de funciones de distribución en superficie $F_s(D_i)$
- 1.6 Ecuación de cálculo de diámetro promedio $D[1,0]$
- 1.7 Ecuación de cálculo de diámetro promedio $D[2,0]$
- 1.8 Ecuación de cálculo de diámetro promedio $D[3,0]$
- 1.9 Ecuación de cálculo de diámetro promedio $D[3,2]$
- 1.10 Ecuación de cálculo de diámetro promedio $D[4,3]$
- 1.11 Ecuación de Span
- 2.1 Ecuación de rendimiento de extracción de las diferentes fracciones de okara e ISPS
- 3.1 Ecuación de concentración de proteína en la dispersión
- 3.2 Ecuación de concentración de proteínas en la dispersión inicial
- 3.3 Ecuación de solubilidad de proteínas (S_p)
- 3.4 Ecuación de presión superficial de equilibrio (π_e)
- 4.1 Ecuación de grado de floculación (GF)
- 4.2 Ecuación de porcentaje de fase acuosa (%FA)
- 4.3 Ecuación del índice de estabilidad de Turbiscan (TSI)

Capítulo 1

Introducción general

1.1 Soja

La soja (*Glycine max* (L.) pertenece a la familia *Leguminosae* y subfamilia *Papilionaceae*. Es probablemente uno de los granos más cultivados en el mundo. La soja, como toda leguminosa, es capaz de utilizar nitrógeno atmosférico a través de la fijación biológica del mismo haciéndola menos dependiente de los fertilizantes de nitrógeno sintético. Aunque su primer uso comercial se relaciona a la extracción de su aceite, en la actualidad se la considera también por su importante contenido proteico. Adicionalmente, la soja se ha utilizado para preparar una extensa variedad de alimentos frescos, fermentados y secos, como el tofu, la leche de soja, la salsa de soja y el miso, tanto en Asia como en otras partes del mundo durante muchos siglos (Probst et al., 1973).

El cultivo de soja se encuentra concentrado geográficamente en solo cuatro países: Estados Unidos, Brasil, Argentina y China. La producción en estos países representa casi el 80% de la producción mundial. En los últimos años India y Paraguay aumentaron su participación en el mercado del grano (Produccion agrícola mundial. 2023). Un 5% adicional se produce en diversos países de Asia (excluyendo China) y África. Entre los cultivos de semillas oleaginosas, la soja tiene una participación de producción global cercana al 50%, seguida por la colza (15%), el algodón (10%) y el maní (9%) (Pratab et al., 2004). La soja es altamente sensible a las fluctuaciones ambientales. Entre sus tensiones abióticas, el agua es su principal factor limitante que tiene un gran impacto en su productividad junto a la temperatura y la extensión del

fotoperiodo. En los últimos años, se han logrado grandes avances en la producción y productividad de la soja, gracias a los desarrollos de versiones transgénicas. Particularmente, según la Bolsa de Cereales de Buenos Aires, la producción nacional de este grano fue cercana a los 50 millones de toneladas durante el periodo 2019, aunque el último año se vio seriamente afectada por la falta de humedad y las altas temperaturas presentes durante la primera mitad del ciclo del cultivo (Bolsa de Cereales, 2021 y 2023).

1.1.1. Composición química de la soja

La soja seca está constituida mayoritariamente por aceite (20%) y proteínas (40%). En comparación con otras legumbres, la soja presenta uno de los mayores contenidos de dichos componentes. La materia seca restante está compuesta por 35% de carbohidratos y un 5% de cenizas (**Figura 1.1**). Otros componentes valiosos encontrados en la soja incluyen fosfolípidos (0,2-0,6%), ácidos fenólicos (0,03%), isoflavonas (0,2% en harina), saponinas (0,5% en harina), ácido fítico (1,7% en harina) y vitaminas (Guo,2009).

Tabla 1.1. Composición química del grano de soja.

Componentes	Materia seca (%)
Proteínas	40
Lípidos	20
Fosfolípidos	0,2-0,6
Carbohidratos	35
Solubles	13,2
Sacarosa	2,5-8,2
Rafinosa	0,1-0,9
Estaquiosa	1,4-4,1
Insolubles	21,8
Cenizas	5,0

Nota. Fuente (Guo, 2009).

1.1.2' Proteínas del grano de soja

La soja contiene aproximadamente 40% de proteínas en peso seco. Las proteínas de soja se clasifican en función de diferentes criterios, como la función biológica en las plantas, los patrones de solubilidad, etc. Seguidamente se enumeran algunas de estas clasificaciones.

1.1.2.1' Clasificación basada en su función biológica

1.1.2.1.1' Proteínas metabólicas

Las proteínas metabólicas incluyen enzimas y proteínas estructurales. Estas desempeñan un papel importante en las actividades celulares normales, incluyendo la síntesis de las proteínas de almacenamiento. Podemos nombrar dentro de este grupo a la hemaglutinina, los inhibidores de tripsina y las lipoxigenasas.

1.1.2.1.2' Proteínas de reserva

Las proteínas de almacenamiento se sintetizan durante el desarrollo de las semillas de soja junto a las reservas de aceite. Durante la germinación de la semilla proporcionan una fuente de nitrógeno y carbono para la plántula en desarrollo. Las proteínas de almacenamiento constituyen el 80% de las proteínas totales. En este grano, las proteínas de almacenamiento son denominadas glicinina y β -conglucina.

1.1.2.2' Clasificación basada en el patrón de solubilidad

1.1.2.2.1' Albúminas

Las albuminas 2S son proteínas de reserva, estas están compuestas por varios componentes que tienen la capacidad de inhibir tripsina y/o α -quimotripsina. Alrededor del 80% de las globulinas se encuentran representadas por tres componentes. El primero designado como proteína α_2 , es un inhibidor principalmente de la quimotripsina. Los otros dos, denominados proteínas α_3 y α_4 , siendo la proteína α_3 denominada como inhibidor de tripsina de Kunitz (Kunitz, 1946, 1947) y la proteína α_4 un isómero de tamaño de la proteína α_3 con la misma actividad inmunológica.

Las albúminas 2S son proteínas solubles en agua y se producen ampliamente en semillas de plantas dicotiledóneas (Youle et al., 1981). En la década de 1920, las albúminas 2S se identificaron como alérgenos en enfermedades profesionales debido a la presencia de casos relacionados con desordenes fisiológicos después de su ingesta, pero solo fueron caracterizadas como la principal fuente de alérgenos de la soja a finales de la década de 1970 (Shewry y Pandya, 1999).

1.1.2.2.2' Globulinas

La globulina 7S básica (Bg7S) es una de las principales globulinas de las semillas de soja. A pesar de su doble composición de subunidades y ensamblaje oligomérico,

Bg7S tiene una estructura 3D compacta (PDB: 3AUP) que se estabiliza mediante una red de puentes disulfuro entre cadenas e intracadenas. Bg7S comparte varios elementos estructurales con varias proteínas homólogas de otras semillas. Aunque constituyen una parte importante de la semilla, presentan una funcionalidad biológica aún incierta (Magni et al., 2018). Estas proteínas son solubles en solución salina. Como en la mayoría de las especies de leguminosas, las globulinas se clasifican en dos grupos: legumina y vicilina. Las leguminas se encuentran compuestas por moléculas de mayor tamaño y menor solubilidad en soluciones salinas y tienen mayor estabilidad térmica en comparación con las vicilinas. En las globulinas de la soja, las leguminas y las vicilinas se conocen comúnmente como glicinina y β -conglícina, respectivamente. Estos nombres comunes son aparentemente derivados del nombre del género de la planta de soja (Guo, 2009).

1.1.2.3 Clasificación basada en el coeficiente de sedimentación

Las diferentes estructuras proteicas se encuentran asociadas entre sí, por lo tanto, no hay garantía de que se extraiga una sola fracción pura en función de la diferencia en solubilidad. Por ello, una forma más precisa de identificar proteínas se ha basado en el cálculo de los coeficientes de sedimentación utilizando ultracentrifugación para separar las proteínas de la semilla. Las proteínas de soja exhiben cuatro fracciones después de la centrifugación que se designan como 2S, 7S, 11S y 15S. Aquí S representa la unidad Svedburg. Se calcula como la velocidad de sedimentación por unidad de campo de resistencia centrífuga basada en la ecuación $S = (dc / dt) / \omega^2 c$ donde c es la distancia desde

el centro de la centrífuga, t es el tiempo y w es la velocidad angular. El valor para S oscila entre 1 y 200, con una unidad de 10-13 segundos (Fukushima, 1991). En base a esta forma de cálculo se definen las siguientes fracciones: *Fracción 2S*: representa aproximadamente el 20% de la proteína extraíble e incluye los inhibidores de tripsina Kunitz y Bowman-Birk y el citocromo c , *Fracción 7S*: representa el 35% de la proteína extraíble y consiste en conglucina, α -amilasa, lipoxigenasa y hemaglutinina, *Fracción 11S*: esta fracción es la glicinina de soja y representa el 35% de proteína extraíble y *Fracción 15S*: se cree que es un polímero de glicinina y representa aproximadamente el 10% de la proteína extraíble (Nir et al., 1994). Esta clasificación es solo para fines de identificación y de ninguna manera implican que las constantes de sedimentación presentan siempre valores constantes. De hecho, los coeficientes de sedimentación dependen en gran medida de las condiciones de composición del tampón, pH y otros factores (Zhao et al., 2008).

1.1.2.3.1' Glicinina y conglucina

Estas son las dos principales globulinas de soja que difieren tanto en calidad nutricional como en propiedades funcionales. La globulina 11S contiene 3-4 veces más metionina y cisteína por unidad de proteína que la proteína 7S. La proteína 11S se vuelve más valiosa desde el punto de vista nutricional porque las proteínas de soja son deficientes en estos aminoácidos que contienen azufre. Las dos globulinas también muestran diferencias considerables en sus propiedades funcionales principales, incluida la

capacidad gelificante, la estabilidad térmica y la capacidad emulsionante. En general, la proteína 11S tiene una mejor capacidad de formación de gel que la globulina 7S. Por otro lado, la proteína 7S tiene una mayor capacidad emulsionante y estabilizante que la globulina 11S (Badley et al., 1975; Kohyama et al., 1995). Se ha informado que el contenido de 11S y la proporción de proteína 11S/7S se correlacionan positivamente con la firmeza del gel de tofu sobre la base de los sistemas de proteína de soja purificada (Mujoo et al., 2003; Nagano et al., 1992). Se ha encontrado que, dependiendo de las condiciones, tanto la glicinina (11S) como la β -conglucina (7S) pueden formar grandes agregados cuando se calientan (Tay et al., 2005).

1.1.2.3.2' Inhibidores de tripsina

Los inhibidores de la tripsina son inhibidores de las proteasas (como la tripsina y la quimotripsina) que se unen a dichas enzimas y producen una disminución en su velocidad de escisión. Los inhibidores de tripsina aislados de la soja son de dos tipos: el inhibidor de tripsina de Kunitz (TI) y el inhibidor de Bowman-Birk (BB). Los mismos están asociados con las proteínas de almacenamiento en la semilla (Herkelman et al., 1993).

El inhibidor de Kunitz fue primero aislado y cristalizado por Kunitz, realizando una extracción acuosa sobre la soja y precipitando el inhibidor con alcohol. Tiene un peso molecular entre 20 y 25kDa, con una especificidad dirigida principalmente hacia la tripsina. Se demostró que el inhibidor se combina estrechamente con la tripsina de forma estequiométrica, es decir, 1 mol del inhibidor inactiva 1 mol de tripsina. La secuencia de

aminoácidos muestra que tiene 181 residuos de aminoácidos y dos enlaces disulfuro, con un sitio reactivo en los residuos Arg⁶³ e Ile⁶⁴ (Guo, 2009).

Por otro lado, el inhibidor de Bowman-Birkse aisló primero extrayendo granos con una solución de alcohol al 60% y precipitando el inhibidor con acetona. Es una fracción insoluble en acetona en contraste con el inhibidor de Kunitz insoluble en alcohol. Tiene un peso molecular de aproximadamente 8kDa. La secuencia de aminoácidos mostró que es una cadena polipeptídica única de 71 aminoácidos que incluye siete enlaces disulfuro. El inhibidor de BB es capaz de inhibir tanto la tripsina como la quimotripsina en sitios reactivos independientes, estando el sitio reactivo de tripsina en los residuos Lys¹⁶ y Ser¹⁷ y el sitio reactivo de quimotripsina en Leu⁴⁴ y Ser⁴⁵. La conformación (estructura secundaria) de este inhibidor tiene 61% de lámina β , 38% de forma desordenada, 1% de giro β y 0% de forma helicoidal, lo que sugiere que tiene una conformación estable incluso después de que los enlaces disulfuro se rompen por calentamiento (Pérez et al., 2003).

1.1.2.3.3' Lectina

Las lectinas, también conocidas como hemaglutininas, son proteínas que poseen una afinidad específica por ciertas moléculas de azúcar. Dado que en la mayoría de las membranas celulares animales existen restos de carbohidratos, las lectinas pueden unirse a estos grupos receptores si presentan una estructura adecuada. Como lo indican sus nombres, las hemaglutininas o lectinas pueden caracterizarse y detectarse por su acción

sobre los glóbulos rojos: la capacidad de aglutinar las células sanguíneas (Peumans et al., 1995).

Las lectinas se caracterizan por un contenido relativamente alto de 4-hidroxiprolina. Su capacidad para aglutinar células resulta de su capacidad para unirse específicamente a polisacáridos en las membranas celulares y actuar como puentes entre las células. Debido a esta característica, las lectinas han proporcionado una nueva herramienta para que los biólogos celulares investiguen la arquitectura de las superficies celulares. Las lectinas de semillas se localizan principalmente en los cuerpos proteicos de las células de cotiledones. La lectina de soja se une con la fracción 7S durante la ultracentrifugación, lo que indica que tiene un coeficiente de sedimentación de 7S. Es una glucoproteína que contiene 5 glucosamina y 37 residuos de manosa por mol y tiene un peso molecular de aproximadamente 120kDa con cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales tiene un peso molecular de 30kDa (Guo et al., 2013).

1.1.3' Lípidos del grano de soja

La soja contiene aproximadamente un 20% de lípidos, que se encuentra principalmente en forma de triglicéridos, en orgánulos conocidos como cuerpos oleosos, cuerpos lipídicos o vesículas que contienen lípidos.

1.1.3.1 Triglicéridos

Los triglicéridos constituyen más del 99 % del aceite de soja refinado. La mayoría de los ácidos grasos en la soja son insaturados como muchos otros aceites de origen vegetal. La composición porcentual promedio de los ácidos grasos en el aceite de soja tiene como componente mayoritario al ácido linoleico (53,2%), seguido en un orden decreciente por el ácido oleico (23,4%), el palmítico (11,0%), el linolénico (7,8%) y el esteárico (4,0%). También contiene algunos ácidos grasos menores, incluyendo el ácido araquídico (0,3%), el behénico (0,1%), el palmitoleico (0,1%) y el mirístico (0,1%) (Boufaïed et al., 2003). La estabilidad química del aceite de soja ha sido un problema porque contiene proporciones relativamente altas de ácidos linoleico y linolénico que contienen 2 y 3 dobles enlaces, respectivamente. Para aumentar el punto de fusión y la estabilidad oxidativa del aceite de soja, se hace necesaria la hidrogenación (Yeom et al., 2003). Por otro lado, existe una gran variación genética en la composición de ácidos grasos del aceite de soja, principalmente como resultado del fitomejoramiento. Debido a esta diferencia, los lípidos de la soja pueden presentar diferencias en sus propiedades físicas, así como en la estabilidad oxidativa durante el almacenamiento.

1.1.3.2 Fosfolípidos

Los fosfolípidos (PL) son una subclase de lípidos que generalmente consisten en un esqueleto de glicerol con posiciones 1,2 conectadas a dos grupos acilo graso a través

de enlaces éster. La tercera posición de glicerol está conectada a un grupo fosfato. El grupo fosfato tiene dos enlaces éster con el esqueleto de glicerol y un grupo de cabeza polar, como colina, etanolamina, inositol, serina y glicerol. Los grupos de cabeza polar corresponden a las subespecies de PL: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS) y fosfatidilglicerol (PG), respectivamente. Estructuralmente, todos los PL son moléculas anfifílicas que sirven como base molecular para sus funciones biológicas y como emulsionantes en productos alimenticios, cosméticos o farmacéuticos (Li et al., 2019).

Los fosfolípidos, junto con las proteínas, actúan como bloques de construcción de las membranas biológicas. Por lo tanto, se encuentran invariablemente en todos los alimentos de origen animal y vegetal. Los fosfolípidos constituyen el 1-3% del aceite de soja crudo. La fosfatidilcolina es uno de sus componentes mayoritarios, constituyendo aproximadamente el 35-40% de los fosfolípidos totales, y el resto es aproximadamente 25% de fosfatidiletanolamina, 15% de fosfatidilinositol y 5-10% de ácido fosfatídico (Chung et al., 2017).

1.1.4' Carbohidratos del grano de soja

Los carbohidratos constituyen aproximadamente el 35% del peso seco de la soja, lo que los convierte en el segundo componente más abundante de la misma. Sus componentes principales son los polisacáridos amilosas y amilopectinas y la fibra no digerible, pero también existen disacáridos como la rafinosa y estaquiosa.

1.1.4.1 Carbohidratos solubles

La fracción de carbohidratos solubles está constituida por sacarosa y oligosacáridos que representan alrededor del 10% de los componentes presentes en el grano. Los oligosacáridos de la soja, rafinosa (α -D-galactosa (1-6)- α -D-glucosa (1-2)- β -D-fructosa) y estaquiosa (α -D-galactosa (1-6)- α -D-galactosa- (1-6)- α -D-glucosa (1-2)- β -D-fructosa) son resistentes a la digestión debido a los enlaces α -galactósidos que conforman su estructura. El contenido de rafinosa y estaquiosa en semillas maduras de soja es del orden de 2,5-8,2% y 1,4-4,5%, respectivamente (Gomes et al., 2005).

1.1.4.2 Carbohidratos insolubles

Los carbohidratos insolubles en la soja incluyen celulosa, hemicelulosa, pectinas y pequeñas cantidades de almidón. Son componentes estructurales que se encuentran principalmente en las paredes celulares. La cubierta de la semilla constituye aproximadamente el 8% de la soja entera en peso seco y contiene aproximadamente el 86% de carbohidratos complejos. Por lo tanto, aporta una cantidad notable de carbohidratos insolubles al grano entero. Las paredes celulares de la soja contienen aproximadamente 30% de pectinas, 50% de hemicelulosa y 20% de celulosa. Cabe resaltar que la mayoría de los carbohidratos de soja entran en la categoría de fibra dietaria (Al Loman y Ju, 2017).

1.2 Usos del grano de soja

El poroto de soja permite la elaboración de numerosos productos: aceite refinado, lecitinas, harinas (entera o desgrasada) activadas o inactivadas, texturizados, aislados (90% proteínas), concentrados (70% proteínas), “leche” (3-4% proteínas), tofu (queso de soja), hidrolizados y productos fermentados. En estos productos se aprovecha fundamentalmente las propiedades funcionales de las proteínas de reserva y de suero de soja. Estas propiedades, incluyen a aquellas dependientes de la interacción con agua (solubilidad, absorción y retención de agua, dispersabilidad, viscosidad), las dependientes de las interacciones proteína-proteína (formación de geles, films, fibras, masa) y las propiedades superficiales (formación-estabilización de espumas y emulsiones, fijación de aromas). Las propiedades funcionales de las proteínas de la soja se pueden mejorar, en menor o mayor grado, por tratamientos térmicos, químicos o enzimáticos. Lo que se debe asegurar siempre es que estos tratamientos conserven el mayor valor nutricional de las proteínas y no ocasionen colores, sabores o aromas desagradables (Fortunato, 2018).

1.3 Subproductos de la industria de la soja

El procesamiento o molienda del grano de soja consiste en principio en una extracción del aceite del poroto de soja obteniendo, por un lado, el aceite de soja, y simultáneamente, las harinas proteicas (Agrofy News, 2020). En la industria alimentaria de la soja, los dos subproductos producidos en mayor escala son el okara (pulpa de soja)

y el suero de soja (**Figura 1.1**), que se generan principalmente a partir de la producción de leche de soja (okara) y tofu (okara y suero) (Fung y Liong, 2010).

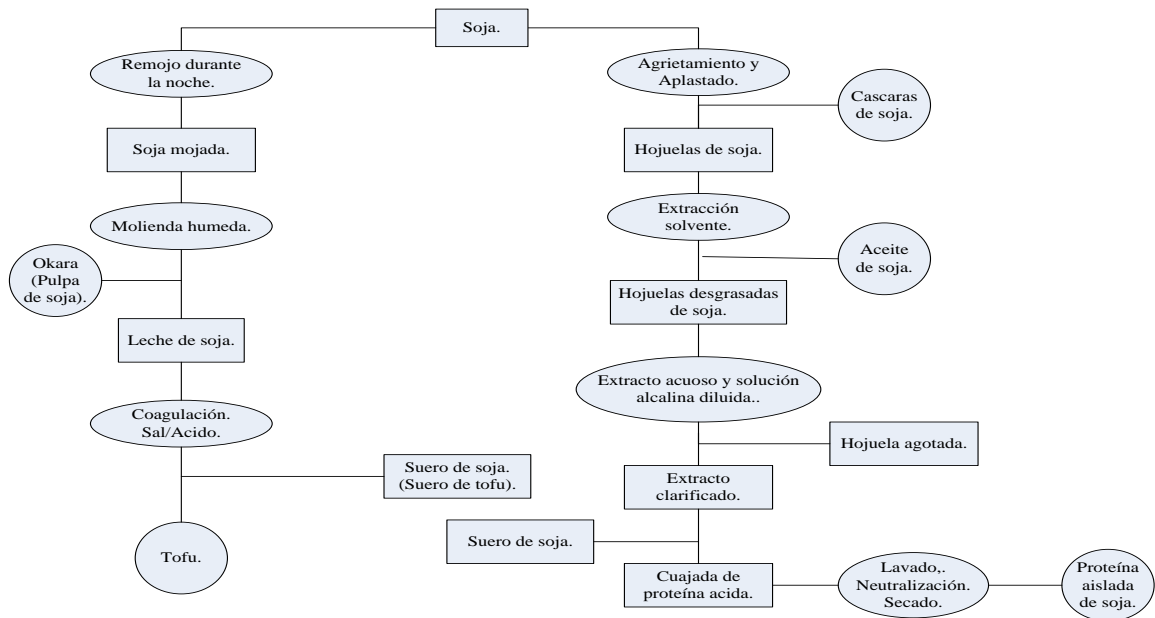


Figura 1.1. Diagrama de flujo general para la producción de subproductos de soja. La información compilada de Thrane et al. (2016).

1.3.1' Harina desgrasada de soja

La harina de soja, como se ha mencionado previamente, es el material resultante de la extracción del aceite utilizando solventes. Esta harina se produce al moler los copos de soja en partículas muy finas y se clasifican según el tamaño de partícula (Perkins, 1995), de modo que el 97% del producto pasa a través de una malla de aproximadamente 150 micrones. La harina de soja se puede utilizar como ingrediente en una amplia

variedad de productos alimenticios, como sopas, guisos, bebidas, postres, productos de panadería, cereales para el desayuno y productos cárnicos. Esta puede encontrarse en dos formatos, con o sin las cáscaras, las cuales aumentan el contenido de fibra de las mismas.

1.3.2' Okara de soja

El okara, también conocido como pulpa de soja, y doufu zha o dou zha en chino, es el residuo insoluble después de filtrar la lechada de soja. Se considera que, por cada kg de soja seca convertida en leche de soja o tofu, se genera aproximadamente 1 kg de okara. Más específicamente, en promedio, el 53% de la masa seca inicial de la soja se recupera en tofu, el 34% en okara y el 16% en suero. Aproximadamente el 72% de la proteína se recupera en el tofu, el 23% en el okara y el 8% en el suero; las respectivas recuperaciones medias de aceite de soja son 82, 16 y <1% (van der Riet et al., 1989).

Por su parte, Maeda. (2000) denomina el okara como el residuo de la extracción alcalina sobre la harina de soja desgrasada, éste representa aproximadamente el 40% de los sólidos en la materia prima y contiene el 15% de las proteínas que entran en el proceso. Por lo general, se pulsa, se seca y se vende como un subproducto de la fabricación ISP (*isolated soybean protein*) y es utilizado en productos para alimentación animal debido a su excepcional capacidad de absorción de agua (Berk, 1992).

El uso principal de okara es la alimentación del ganado, sin embargo, hay varias formas de utilizar okara como alimento. Con una conciencia cada vez mayor del papel de la fibra dietética en la salud humana, aumenta el interés en usar okara como ingrediente

alimentario. Por ejemplo, el okara simple o con sabor se puede deshidratar fácilmente en un secador de tambor para hacer un alimento básico seco, que se puede moler aún más en harina antes de usarse como un ingrediente alimenticio con alto contenido de fibra. Además, existe un creciente interés de investigación en okara debido a los posibles beneficios para la salud (Matsumoto et al., 2007; Fukuda et al., 2006), se han estudiado variantes de los procesos de secado, obtención y fraccionamiento de okara (Surel y Couplet, 2005; Ranaldi et al., 2000).

Existen diferentes tipos y procedimientos para la extracción de okara, entre ellos; modificaciones físicas (explosión de vapor, hidrólisis de agua subcrítica, sistema de chorro de agua, homogeneización a alta presión, molienda planetaria de bolas de medios húmedos y ultrasonido), químicas (precipitación ácida y tratamiento alcalino), biológicas, enzimáticas, bacterianas (con bacterias acidolácticas, no acidolácticas, o cepas de levadura) (Lyu et al., 2021).

Particularmente, en esta investigación nos referimos al okara de soja procedente de copos desgrasados (Feng et al., 2021), empleando para su procedimiento una combinación de un proceso químico (extracción alcalina) y uno físico (ultrasonido de alta frecuencia), este último proceso es aplicado antes o después de la extracción alcalina.

1.3.2.1 Polisacáridos insolubles de soja (ISPS)

Las fracciones enriquecidas en polisacáridos se obtienen por el método propuesto por Fuji et al. (2010), este método consta de dos etapas principales. En la primera etapa, luego de la eliminación de los componentes solubles de la harina desgasada de soja en medio alcalino, se obtiene el residuo insoluble denominado okara. Posteriormente, los polisacáridos del okara pueden separarse en solubles e insolubles bajo condiciones de extracción ácida, alta temperaturas y presión elevadas (pH 3-3,5, 120°C, 1atm barométrica). A partir de la fracción soluble extraída en esas condiciones se obtiene un producto que contiene un alto contenido de polisacáridos y una baja concentración de proteínas, denominado SSPS (*soluble soybean polysaccharides*), comercializado bajo el nombre de “SoyaFIBE-S” por la firma Fuji Oil Co. desde 1993 (Maeda, 2000). Por otro lado, actualmente solo existe un limitado número de fuentes de literatura específica sobre la fracción insoluble resultante, denominada polisacáridos insolubles de soja (ISPS), siendo una de las primeras en el tema la generada por el grupo de investigación donde se ha realizado el presente trabajo (Porfiri et al., 2017).

1.3.3 Modificación tecnológica de okara de soja mediante ultrasonido

El ultrasonido de alta energía es una tecnología emergente que ha atraído considerable atención en la industria alimentaria en los últimos años. Esto se debe a que tiene muchas ventajas: es relativamente económico, respetuoso con el medio ambiente y

fácil de operar, todo lo cual mejora la calidad de los alimentos y el desarrollo de alimentos funcionales (Minjares-Fuentes et al., 2016). El ultrasonido puede ejercer sus efectos sobre la estructura y la morfología de diversas macromoléculas (polisacáridos, proteínas, etc.) (Bagherianet al., 2011).

Cuando se habla de ultrasonido, se hace referencia a ondas sonoras con una frecuencia superior a la perceptible por el oído humano, mayores de 16kHz. El ultrasonido es generado por una corriente eléctrica, que es transformada en energía sonora por medio de diferentes transductores (líquidos, magnéticos o piezoeléctricos). Al someter a un alimento a estas ondas, se producen diversos fenómenos, entre ellos la cavitación, la cual se basa en la formación, crecimiento e implosión de diminutas burbujas de vapor o gas debido a la acción del campo ultra sonoro dentro de un líquido. Durante el colapso de las burbujas, se producen grandes incrementos de temperatura (500°C) y presión (500MPa) en puntos localizados de la muestra. Estos cambios físicos producen la ruptura de la pared celular, la reducción del tamaño de las partículas y el incremento de la masa que se transfiere a través de las membranas (Zalua et al., 2014).

Moczowska et al. (2019) evaluaron el efecto de varios métodos de extracción, incluidos enzimático-ultrasónico, enzimático y alcalino, sobre las características fisicoquímicas de la fibra dietaria soluble de la linaza. Estos autores encontraron que el mayor contenido de fibra dietaria soluble se obtuvo del tratamiento enzimático-ultrasónico. Khawas y Deka (2016) descubrieron que aumentar la potencia de salida de la ultrasonicación reduce el tamaño de las nanofibras de celulosa de la cáscara de plátano

culinaria y genera una estructura más delgada similar a la de una aguja. Sin embargo, los cambios en las propiedades de las diversas macromoléculas que componen el okara de soja, después del tratamiento con ultrasonido con diferentes intensidades de energía, rara vez se han investigado (Fan et al., 2020).

1.4 Propiedades funcionales de los biopolímeros

Los biopolímeros clasificados como polisacáridos (por ejemplo, quitina, quitosano, alginato, agarosa, polímeros a base de celulosa, almidón y carragenano) o proteínas (por ejemplo, proteína de soja, fibroína, sericina, gelatina y colágeno), se han utilizado solos o combinados para múltiples aplicaciones (Silva et al., 2020).

Los biopolímeros son comúnmente utilizados por la industria alimentaria para mejorar la estabilidad y textura de los productos alimenticios a base de emulsión (Friberg et al., 2004; McClements., 2005). Una amplia variedad de productos alimenticios puede clasificarse como emulsiones, incluida la leche, la crema, la leche batida, helados, yogures, refrescos, bebidas nutritivas, fórmula infantil, postres, salsas, aderezos, mayonesa, queso, productos para untar, mantequilla y margarina (Friberg et al., 2004; McClements, 2005). Algunos de estos productos contienen naturalmente biopolímeros funcionales (como la leche), mientras que otros contienen biopolímeros que se han agregado como ingredientes debido a sus atributos funcionales únicos (como aderezos y salsas) (McClements, 2005).

Estos biopolímeros son compuestos que pueden presentar actividad superficial e interfacial. Dichos compuestos pueden ser considerados como macromoléculas anfifílicas que juegan un papel esencial en la estabilización de formulaciones alimentarias (espumas, emulsiones y dispersiones). En condiciones específicas (proporción de proteína-polisacárido, pH, fuerza iónica, temperatura y procesamiento de la mezcla), se ha determinado que las proteínas y polisacáridos forman híbridos (complejos) con propiedades funcionales mejoradas en comparación a las que poseen estas moléculas analizadas en forma individual (Benichou et al., 2002).

1.4.1' Los polisacáridos y su rol como biopolímeros tecnofuncionales

Los polisacáridos son, desde un punto de vista general, carbohidratos poliméricos compuestos de unidades de monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos en estructuras lineales o altamente ramificadas. Como consecuencia de su estructura, pueden asumir diferentes propiedades. En general, los polisacáridos de origen natural son carbohidratos simples con una unidad única de repetición de monosacáridos, que se pueden obtener o sintetizar a partir de una gran cantidad de recursos renovables. Los polisacáridos, independientemente de su concentración, juegan un papel clave en la determinación de la textura de los alimentos. Sus propiedades funcionales, ampliamente utilizadas al momento de desarrollar productos alimenticios, son las de espesante, gelificante y de acción hidrocoloide. Los polisacáridos con carga tienen una habilidad especial para interactuar con otros componentes alimentarios, tales como proteínas, lípidos u otros

polisacáridos, modificando diferentes propiedades de los alimentos (Steinhardt y Beychok, 1964).

1.4.2' Las proteínas y su rol como biopolímeros tecnofuncionales

Las proteínas son macromoléculas que existen en los sistemas vivos, compuestas de unidades estructurales llamadas aminoácidos que están unidas en largas cadenas. Las proteínas contienen principalmente carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y algunas se componen de azufre y fósforo. Estas estructuras difieren en el número y tipo de aminoácidos que se ensamblan para formar la cadena de polipéptidos y su estructura 3D, definiendo las propiedades funcionales de las mismas (Cagri et al., 2004). Las proteínas son generalmente sistemas autoensamblados debido a la presencia de diferentes interacciones intermoleculares, tales como enlaces de hidrógeno, puentes disulfuro, puentes salinos e interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas.

Las propiedades funcionales, también llamadas más apropiadamente tecnofuncionales, se definen como las propiedades fisicoquímicas que afectan el comportamiento de las proteínas en los sistemas alimenticios durante el procesamiento, almacenamiento y consumo de los mismos (Kinsella, 1979). Por su parte, Chelftel et al. (1989) define las propiedades funcionales como aquellas propiedades de las proteínas, diferentes de las que se relacionan con la nutrición, que condiciona su empleo en alimentos. Las propiedades funcionales de las proteínas se relacionan con las interacciones de las mismas con el agua, los lípidos, los hidratos de carbono, e

interacciones proteína-proteína (Phillips et al., 1994). Las proteínas tienen diversas propiedades funcionales y éstas pueden clasificarse de acuerdo con el tipo de interacción molecular. Entre estas se encuentran, las propiedades de hidratación dependientes de la interacción proteína-agua, su criterio funcional son la solubilidad, dispersabilidad, viscosidad, hinchamiento, adsorción - sorción y la retención de agua, también existen las propiedades dependientes de las interacciones proteína-proteína como lo es la precipitación y la gelificación y por último las propiedades de superficie como propiedades emulsificantes y espumantes. El mecanismo principal para interactuar con su entorno le proporciona a cada proteína particular una determinada propiedad funcional predominante, aun cuando los otros tipos de interacciones se encuentran presentes.

1.5 Estudio de las propiedades emulsificantes

1.5.1 Emulsiones

Una emulsión es una mezcla heterogénea de dos líquidos inmiscibles (generalmente aceite y agua), con uno de los líquidos dispersos en forma de pequeñas gotas esféricas en el otro (**Figura 1.2**). En la mayoría de las emulsiones alimentarias, los diámetros de las gotas generalmente se encuentran entre 0,1 y 100 μ m (Dickinson y Stainsby, 1982; Dickinson 1992; Walstra 1996a, b).

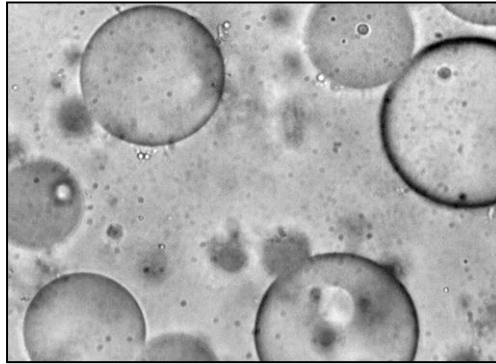


Figura 1.2. Microscopía óptica de una emulsión aceite en agua O/W estabilizada con okara de soja al 4% m/m. Las formas circulares representan las gotas de aceite (fase dispersa) y el resto corresponde a la fase acuosa (dispersante).

La concentración de gotas en una emulsión generalmente se describe en términos de la fracción de volumen de fase dispersa (ϕ), que es igual al volumen de gotas de emulsión y (ϕ_m) a la fracción másica de la fase dispersa. Si V_d y m_d son el volumen y la masa de la fase dispersa, respectivamente, y V_e y m_e , el volumen y la masa de la emulsión, respectivamente, entonces ϕ y ϕ_m se definen de acuerdo a las ecuaciones **Ec 1.1** y **1.2** (McClements, 1999):

$$\phi = V_d/V_e \text{ (Ec. 1.1)}$$

$$\phi_m = m_d/m_e \text{ (Ec. 1.2)}$$

Ambos parámetros pueden relacionarse conociendo las densidades de las fases dispersa (δ_d) y continua (δ_c) **Ec. 1.3**:

$$\varphi_m = [(\varphi\delta_d / \varphi\delta_d + (1-\varphi)\delta_c)] \text{ (Ec. 1.3)}$$

Los valores de φ y φ_m coinciden sólo cuando las densidades de las dos fases que constituyen el sistema son iguales (McClements, 1999).

1.5.2' Clasificación o tipo de emulsiones alimentarias

Las emulsiones se pueden clasificar convenientemente de acuerdo con la distribución del aceite y las fases acuosas **Figura 1.3**. Un sistema que consiste en gotas de aceite dispersas en una fase acuosa se denomina emulsión aceite en agua o emulsión O/W (por ejemplo, mayonesa, leche, crema, sopas y salsas). Un sistema que consiste en gotas de agua dispersas en una fase oleosa se denomina emulsión agua en aceite o emulsión W/O (por ejemplo, margarina, mantequilla y productos para untar). La sustancia que forma las gotas en una emulsión se denomina fase dispersa o interna, mientras que la sustancia que forma el líquido circundante se llama fase continua o externa. También, es posible preparar emulsiones múltiples del tipo aceite en agua en aceite (O/W/O) o agua en aceite en agua (W/O/W) (Dickinson y McClements 1995). Por ejemplo, una emulsión W/O/W consiste en gotas de agua dispersas dentro de gotas de aceite más grandes, que se dispersan en una fase acuosa continua (Evison et al., 1995). Se han llevado a cabo investigaciones para crear emulsiones múltiples estables que pueden usarse para controlar la liberación de ciertos ingredientes, reducir el contenido total de

grasa de los productos alimenticios a base de emulsión o aislar un ingrediente de otro (Dickinson y McClements 1995).

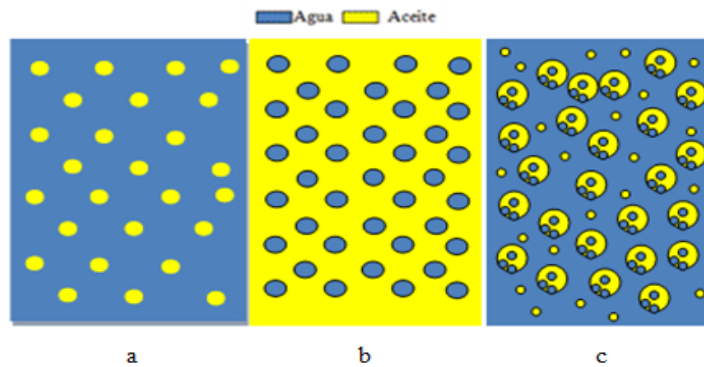


Figura 1.3. Representación gráfica de diferentes tipos de emulsiones: a) emulsión aceite en agua (O/W); b) emulsión agua en aceite (W/O); c) emulsiones múltiples (W/O/W).

1.5.3 Tipos de emulsificantes

Los emulsionantes son moléculas con actividad superficial que se adsorben rápidamente en las superficies de las gotas formadas dentro de un homogeneizador durante el proceso de formación de la emulsión, donde crean una capa protectora que ayuda a evitar que las gotas se acerquen y agreguen. La mayoría de los emulsionantes alimentarios son moléculas anfifílicas, como los emulsionantes a base de lípidos (tensoactivos de moléculas pequeñas y fosfolípidos) y biopolímeros (proteínas y polisacáridos). Además, algunos tipos de pequeñas partículas sólidas también son superficialmente activas y pueden actuar como emulsionantes, por ejemplo, los gránulos de mostaza. Algunos de los tipos de emulsionantes más comunes son:

- **Tensoactivos de moléculas pequeñas:** se refieren a aquellas moléculas relativamente pequeñas ($\leq 10^3$ Da) que consisten en un grupo de 'cabeza' hidrófilo, que tiene una alta

afinidad por el agua, unido a un grupo de 'cola' lipófilo, que tiene una alta afinidad por el aceite (Goff, 1997).

- **Monoglicéridos:** se refieren a una serie de tensioactivos producidos por interesterificación de grasas o aceites con glicerol. La capacidad de los monoglicéridos destilados para interactuar con el agua y formar fases y dispersiones mesomórficas en sistemas acuosos es una característica única, que se utiliza en muchas preparaciones alimenticias donde las interacciones con ingredientes solubles en agua (p. ej., componentes de almidón) o las propiedades aireantes de productos sin grasa son importantes (Goff, 1997, 2000).

- **Lecitinas:** las lecitinas son un emulsionante alimenticio natural que se pueden extraer de una variedad de fuentes, incluidas la soja, la colza y el huevo. La lecitina de soja es el ingrediente tensioactivo más utilizado en la industria alimentaria porque puede extraerse económicamente durante el procesamiento de refinación del aceite de soja crudo. Las lecitinas contienen una mezcla compleja de diferentes tipos de fosfolípidos y otros lípidos, aunque se pueden fraccionar para formar ingredientes más puros que se enriquecen con fracciones particulares. Los fosfolípidos más comunes en la lecitina son la fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilinositol (PI). Los grupos de cabeza hidrófilos de estas moléculas son aniónicos (PI) o bipolares (PC y PE), mientras que los grupos de cola lipófilos constan de dos ácidos grasos (van Nieuwenhuyzen y Szuhaj, 1998).

1.5.3.1 Emulsionantes proteicos

Las membranas interfaciales formadas por proteínas suelen ser relativamente delgadas y cargadas eléctricamente, por lo que el principal mecanismo que evita la floculación de las gotas en las emulsiones estabilizadas por proteínas es la repulsión electrostática (McClements, 2004). En consecuencia, las emulsiones estabilizadas con proteínas son particularmente sensibles a los efectos del pH y la fuerza iónica y tenderán a flocular a valores de pH cercanos al punto isoelectrico (pI) de las proteínas adsorbidas y cuando la fuerza iónica supere un cierto nivel (Dickinson, 2010). Las emulsiones estabilizadas por proteínas globulares también son particularmente sensibles a los tratamientos térmicos porque estas proteínas se despliegan cuando la temperatura excede un valor crítico, exponiendo grupos reactivos no polares y sulfidrilo (Galazka et al., 1999).

1.5.3.2 Emulsionantes de polisacáridos

Un estabilizante o estabilizador es un compuesto químico normalmente de naturaleza macromolecular que hidratado en la fase acuosa confiere a una emulsión O/W una estabilidad física durante un tiempo prolongado. La estabilización de la emulsión se consigue restringiendo la movilidad de las gotas de la fase dispersa, gracias al aumento de viscosidad y, en ocasiones de la viscoelasticidad, de la fase continua. Los estabilizantes contribuyen a la estabilidad de la emulsión favoreciendo principalmente las

interacciones estéricas entre las gotas, si bien también pueden ser significativas las electrostáticas. Como ejemplos de estabilizantes se pueden citar:

-Goma arábica: este compuesto deriva del exudado natural de distintas especies del género *Acacia*, principalmente de *Acacia senegal* y consta de al menos tres fracciones de biopolímeros de alto peso molecular. La fracción tensioactiva consiste en bloques de arabinogalactano ramificados unidos a una estructura polipeptídica. Se considera que la cadena polipeptídica hidrófoba ancla las moléculas a la superficie de la gota, mientras que los bloques de arabinogalactano hidrófilos se extienden hasta la solución (Dror et al., 2006). La membrana interfacial formada por goma arábica proporcionaría estabilidad contra la agregación de gotas principalmente a través de la repulsión estérica, pero también con alguna contribución de la repulsión electrostática (McNamee et al., 1998). Se ha examinado la influencia de una variedad de condiciones de procesamiento sobre la funcionalidad de la goma arábica. Por ejemplo, se ha demostrado que las emulsiones estabilizadas con goma arábica permanecen estables a la floculación de las gotas cuando se exponen a una amplia gama de condiciones, por ejemplo, pH (3 a 9), fuerza iónica (0 a 25mM de CaCl_2) y tratamiento térmico (30-90°C) (Nakauma et al., 2008; Chanamai y McClements, 2002).

- Almidones modificados: los almidones naturales son moléculas hidrófilas que tienen poca actividad superficial. No obstante, se pueden convertir en emulsionantes eficaces

uniendo químicamente restos hidrófobos a lo largo de su columna vertebral (Nilsson y Bergenstahl, 2006). Estos almidones se utilizan ampliamente como emulsionantes en la industria de bebidas. Uno de los almidones modificados más comúnmente usados es un derivado succinato de octenilo de maíz ceroso. Consiste principalmente en amilopectina que ha sido modificada químicamente para contener un grupo lateral que no es polar. Estos grupos laterales anclan la molécula a la superficie de la gota de aceite, mientras que las cadenas de almidón hidrófilo sobresalen hacia la fase acuosa y protegen las gotas contra la agregación a través de la repulsión estérica (Nilsson y Bergenstahl, 2007). Debido a que el mecanismo estabilizador dominante es la repulsión estérica, las emulsiones estabilizadas por almidón modificado son resistentes a los cambios de pH (3-9), fuerza iónica (CaCl_2 0-25 mM) y temperatura (30-90°C) (Chanamai y McClements, 2002). Al igual que la goma arábiga, el almidón modificado tiene una actividad interfacial relativamente baja (en comparación con las proteínas u otros tensioactivos de menor peso molecular), por lo que debe añadirse un gran exceso para garantizar que todas las superficies de las gotas se recubran adecuadamente (Chanamai y McClements, 2001). Los almidones modificados generalmente se encuentran en forma de polvo o granulados que se dispersan fácilmente en agua fría.

1.5.3.3' Complejos de proteínas y polisacáridos como emulsionantes

Las proteínas poseen una mayor capacidad para reducir el tamaño de las gotas de emulsión, aún al ser utilizadas en concentraciones bajas, si se las compara con los

polisacáridos. Por otro lado, los polisacáridos tienden a poseer una mejor capacidad para producir emulsiones que son estables a un rango más amplio de condiciones ambientales, por ejemplo, pH, fuerza iónica, temperatura, ciclo de congelación-descongelación. Por tanto, puede ser ventajoso combinar los atributos beneficiosos de estos dos tipos de biopolímeros para producir pequeñas gotas de emulsión con buena estabilidad medioambiental. Varios investigadores han demostrado que los complejos proteína-polisacárido pueden tener mejores propiedades emulsionantes que cualquiera de los biopolímeros utilizados de forma aislada (Akhtar y Dickinson, 2007; Chevalier et al., 2001). Estos complejos pueden mantenerse juntos mediante interacciones físicas o covalentes y pueden formarse antes o después de la homogeneización. También existen complejos proteína-polisacárido de origen natural como la goma arábiga que ya se utiliza ampliamente en la industria alimentaria como emulsionante (Dickinson et al., 1991). En términos generales, los ingredientes que se pretendan utilizar para generar estas interacciones deberán ser aptos para su utilización en alimentos, ser económicamente viables y mostrar beneficios sobre los ingredientes existentes que encuentren en uso generalizado en la industria alimentaria.

1.5.4' La interacción proteína-polisacárido

Las combinaciones de proteínas y polisacáridos permiten diseñar un conjugado anfifílico para anclarse fuertemente a la interfase de agua-aceite, a través de las regiones hidrofóbicas de la proteína, lo que conduce a una capa viscoelástica, con una región de

polisacáridos (copolímero) no absorbente que proporciona una estabilización estérica mejorada (Dickinson, 2008), pudiendo en ciertas ocasiones conducir a un comportamiento gelificante.

1.5.5 Importancia de las emulsiones en el área de los alimentos

Las emulsiones intervienen parcial o totalmente en la estructura de muchos alimentos naturales o procesados, como la leche, la crema y los refrescos. Sin embargo, también existen algunos productos alimenticios que han sido emulsionados durante la producción como sopas en polvo, salsas y cremas de café (McClements, 2005, 2012).

La evolución de este tipo particular de matriz alimentaria, ha implicado cambios no sólo en el desarrollo de los productos en sí mismos sino también en las tecnologías relacionadas a sus procesos de elaboración. Así, la cantidad de alimentos emulsionados se ha diversificado notablemente (Palazolo, 2006). En este sentido, existen en el mercado emulsiones alimentarias tradicionales de contenido lipídico reducido o “light” (crema de leche, mayonesa, manteca, cremas heladas), con adición de componentes benéficos para la salud, bebidas (“soft drinks”), sustitutos de leche o crema de leche (“coffee whiteners”), leche de soja y derivados, aderezos, salsas y alimentos especiales para determinados segmentos de la población (niños, ancianos) (Palazolo, 2006; Márquez, 2009).

1.5.6 Homogenización o formación de emulsiones

Para preparar la emulsión, se necesitan aceite (fase oleosa), agua (fase acuosa), surfactante (tensioactivo) y energía (Tadros et al., 2004). El aceite y el agua actúan como fase dispersa o continua según la naturaleza de la emulsión. El surfactante actúa en la interfaz entre el aceite y el agua para estabilizar el sistema de emulsión. La energía se requiere para permitir la creación de área a través de la reducción del tamaño de gota de la fase dispersa. Los emulsionantes/estabilizadores se disuelven en el agua o el aceite dependiendo de la solubilidad del emulsionante y del tipo de emulsión esperado (Adheeb Usaid et al., 2014). Se requiere la disolución del emulsionante antes de que pase por el proceso de emulsificación. Hay una serie de técnicas disponibles para producir una emulsión, que se clasifican como (1) enfoque de alta energía/intensidad, (2) enfoque de baja energía/ intensidad (Tadros et al., 2004; Acosta, 2009; Leong et al., 2009; McClements, 2010; Qian y McClements, 2011; Adheeb Usaid et al., 2014). Los enfoques de alta energía utilizan fuerzas disruptivas intensas, producidas por dispositivos mecánicos, para romper las gotas de aceite, como homogeneizadores de válvulas de alta presión, microfluidizadores y métodos de sonicación (Gutiérrez et al., 2008; Leong et al., 2009; Velikov y Pelan, 2008; Wooster et al., 2008; McClements, 2010). En contraste, los enfoques de baja energía se basan en la formación espontánea de diminutas gotas de aceite dentro de sistemas mixtos de surfactante aceite-agua, cuando la solución o las condiciones ambientales se transforman, por ejemplo, métodos de inversión de fase y mezcla de solventes (Anton et al., 2008; Bouchemal et al., 2004; Chu et al., 2007;

Freitaset al., 2005; Tadros et al., 2004; Yin et al., 2008). La selección del enfoque de emulsificación específico y el tamaño mínimo de las gotas producidas por estos métodos depende de muchos factores, como el tipo y la naturaleza del emulsionante, la proporción de emulsionante en el sistema de emulsión, las composiciones de la fase oleosa y la viscosidad de las fases.

1.5.6.1 Homogeneizador de alta presión

El homogeneizador de alta presión es un equipo ampliamente utilizado para producir emulsiones finas (homogeneización secundaria). Actualmente, también es un método muy popular para la formulación de nanoemulsiones para la industria alimentaria (Schubert y Engel, 2004; Piorkowski y McClements., 2014). En esta técnica, la mezcla de aceite, agua y surfactante se expone a una presión muy alta y se bombea a través de una válvula resistiva. Este dispositivo es muy eficaz para reducir el tamaño de las gotas de aceite a través de una alta fuerza de cizallamiento permitiendo preparar una emulsión fina. Sin embargo, se vuelve más eficaz cuando pasa por el proceso de dos pasos. Al principio, el aceite, el agua y el tensioactivo se mezclan utilizando un mezclador de alta velocidad para preparar una emulsión gruesa (homogeneización primaria) (Troncoso et al., 2012; Piorkowski y McClements, 2014; Tabibiazar et al., 2015). Después de eso, la emulsión gruesa se bombea a una cámara homogeneizadora y en consecuencia fuerza el flujo a través de una válvula estrecha en el extremo de la cámara en su carrera hacia adelante. Al pasar a través de la válvula, la emulsión pasa por una combinación de

fuerzas disruptivas intensas que resultan en la separación de las gotas grandes en varias gotas más pequeñas (**Figura 1.4**).

Los diversos diseños de válvulas y homogeneizadores trabajando en diferentes rangos de presiones se diferencian básicamente en la eficiencia del proceso de homogeneización. En este sentido, el tamaño de la gota formada a partir del homogeneizador de alta presión se reduce a mayores intensidades de la presión y con un mayor número de pasadas a través del homogeneizador. Por lo general, las gotas pequeñas solo se pueden formar cuando la relación de viscosidad de la fase dispersa a continua disminuye dentro de un cierto rango (Tadros et al., 2004; Walstra, 1993, 2003; Piorkowski y McClements, 2014). McClements. (2005) informó que existe una relación lineal entre el logaritmo de la presión de homogeneización (P) y el logaritmo del diámetro de la gota (d): $\log d \propto \log P$, con una constante de proporcionalidad dependiendo del tipo de homogeneizador.

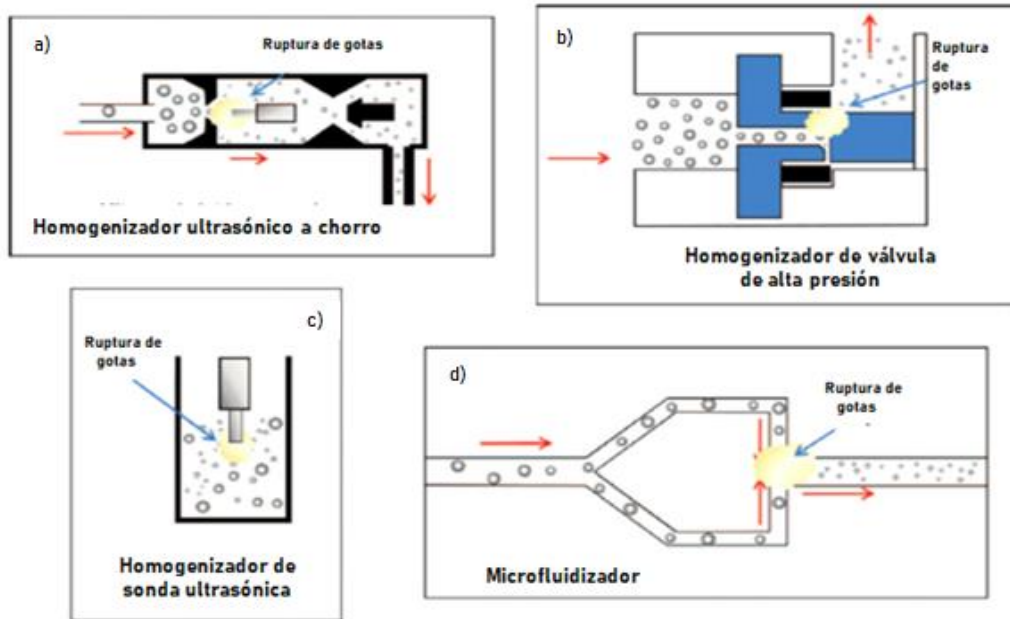


Figura 1.4. Representación esquemática de dispositivos mecánicos que se pueden usar para producir emulsiones utilizando el enfoque de alta energía: a) homogeneizador ultrasónico a chorro, b) homogeneizador de válvula de alta presión, c) homogeneizador de sonda ultrasónico y d) microfluidizador (McClements y Rao, 2011).

1.5.6.1.1 Homogeneización ultrasónica

Los métodos de sonicación necesitan ondas ultrasónicas de alta intensidad (frecuencia > 20kHz) para producir emulsiones que contienen gotas muy finas (Abismaïl et al., 1999; Jafari et al., 2007; Kentish et al., 2008; Leong et al., 2009). En el método ultrasónico, las gotas de emulsión se producen por cavitación, cuando dos líquidos inmiscibles son sometidos a ondas sonoras de alta frecuencia. Estas se generan como resultado ondas de choque intensas en el líquido circundante y el desarrollo de chorros de líquido a alta velocidad (Silva et al., 2012) (**Figura 1.4c**). Hay dos conjuntos de

mecanismos involucrados con la emulsificación mediante el uso del método ultrasónico. Primero, la dispersión de la fase oleosa (en forma de gotas) en la fase continua ocurre por la acción del campo acústico producido por ondas interfaciales. En segundo lugar, la formación y posterior colapso de microburbujas produce niveles extremos de turbulencia altamente localizada (Gadhavé, 2014). Estas microimplosiones turbulentas rompen las gotas primarias en tamaños submicrónicos. Adicionalmente, esta ruptura libera energía térmica aumentando la temperatura de la emulsión, por ello estos equipos deben acoplarse a un sistema de enfriamiento (Abbas et al., 2013).

Aunque la técnica ultrasónica puede ofrecer un alto esfuerzo cortante debido a la cavitación acústica, el tamaño final de la gota de emulsión depende del efecto dual de la velocidad de corte y la reología de la emulsión (Mason et al., 2006). En general, los homogeneizadores ultrasónicos continuos son los más populares para la producción a gran escala de emulsiones finas (Leong et al., 2009). La naturaleza y cantidad del emulsionante, la viscosidad de las fases dispersas y continuas tiene una gran influencia en la eficiencia de la emulsificación / homogeneización (Jafari et al., 2006; Kentish et al., 2006; Leong et al., 2009; Maa y Hsu, 1999). En este sentido, los homogeneizadores ultrasónicos se aplican principalmente a fluidos de baja viscosidad, y son menos apropiados para fluidos de alta viscosidad (Piorkowski y McClements, 2014).

1.5.6.1.2' Microfluidizadores

Los microfluidizadores son similares en diseño hasta cierto punto con el homogeneizador de alta presión porque bombean la premezcla de emulsión gruesa y pasan a través de alta presión para producir gotas finas (Schultz et al., 2004; Jafari et al., 2006, 2007; Kentish et al., 2006). Sin embargo, los canales a través de los cuales se prepara la emulsión gruesa para fluir dentro del equipo son diferentes (Piorkowski y McClements, 2014). En el homogeneizador de alta presión, el punto donde se produce la gota de emulsión es la válvula de presión; por otro lado, en los microfluidizadores se produce una emulsión fina justo después de pasar por el orificio estrecho. El microfluidizador divide el flujo de emulsión gruesa en corrientes y las dos corrientes fluyen a través de dos canales a alta presión, finalmente las mismas chocan entre sí a alta velocidad en una cámara de interacción **Figura 1.4a**. Las intensas fuerzas disruptivas producidas en la cámara de interacción conducen a la descomposición de gotas grandes en gotas de emulsión muy finas. Varios investigadores han observado la posible aplicación de microfluidizadores para la producción de nanoemulsiones aptas para alimentos (Abismaïl et al., 1999; Jafari et al., 2006; Leong et al., 2009; Henry et al., 2010). El tamaño de las gotas de la emulsión preparada tiende a reducirse con el aumento de la presión de homogeneización, el número de pasadas, la concentración de emulsionante y la disminución de la relación de viscosidad de la fase dispersa a continua (Wooster et al., 2008).

1.5.6.2 Aplicaciones de baja intensidad

En aplicaciones de baja energía, la creación de una emulsión depende de la formación espontánea de pequeñas gotas de aceite dentro de mezclas de aceite-agua-emulsionante, cuando su composición o las condiciones ambientales cambian (Anton y Vandamme, 2009; Anton et al., 2008; Bouchemal et al., 2004; Yin et al., 2009; Piorkowski y McClements, 2014). Hay varios métodos disponibles basados en técnicas de baja energía, que incluyen la emulsificación espontánea, los métodos de inversión de fase y la emulsificación de membrana (Anton y Vandamme, 2009; Anton et al., 2008; Fernandez et al., 2004; Maestro et al., 2008; Piorkowski y McClements, 2014; Gadhav, 2014). Algunas de estas técnicas de bajo consumo energético se utilizan actualmente en el procesamiento de alimentos para la formación de nanoemulsiones O/W, especialmente en la producción de bebidas (Piorkowski y McClements, 2014). Para producir gotas de tamaños pequeños o nanoemulsiones, los métodos de baja energía suelen ser más eficientes que los de alta energía, mientras que los métodos de baja energía tienen pocas limitaciones en ciertos tipos de aceite y emulsionantes. Por ejemplo, en la mayoría de las aplicaciones de baja energía, las proteínas o polisacáridos no son adecuados para utilizarse como emulsionantes para formar emulsiones finas. En su lugar, se requieren altas concentraciones de tensioactivos sintéticos para producir una emulsión estable, lo que limita su aplicación en algunos productos alimenticios (Piorkowski y McClements, 2014).

1.5.7 Mecanismos físicos de desestabilización de emulsiones

El término “estabilidad de la emulsión” describe la capacidad de una emulsión para resistir los cambios en sus propiedades con el tiempo. La velocidad a la que una emulsión se rompe y el mecanismo por el que ocurre este proceso dependen de la composición y la microestructura del sistema, así como las condiciones ambientales que experimenta durante su vida útil (Márquez, 2009).

La estabilidad de la emulsión es muy importante en términos de aplicación y almacenamiento. Las emulsiones son sistemas de equilibrio, pero termodinámicamente desfavorables, que tienden a desestabilizarse con el tiempo debido a una serie de mecanismos fisicoquímicos, entre los que se encuentran la separación gravitacional, la floculación, la coalescencia y la maduración de Ostwald (Dickinson, 1992; Friberg et al., 2004; McClements, 2005).

1.5.7.1 Separación gravitacional

En general, las gotas en una emulsión tienen una densidad diferente a la del líquido que las rodea, por lo que una fuerza gravitacional neta actúa sobre ellas (Dickinson y Stainsby 1982, Hunter 1989, Dickinson 1992, Walstra 1996a, b). Si las gotas tienen una densidad más baja que el líquido circundante, tienen una tendencia a moverse hacia arriba, lo que se conoce como proceso de cremado (**Figura 1.5**). Por el contrario, si tienen una densidad más alta que el líquido circundante, tienden a moverse hacia abajo, lo

que se conoce como proceso de sedimentación. Las densidades de la mayoría de los aceites comestibles (en su estado líquido) son más bajas que las del agua, por lo que existe una tendencia a que el aceite se acumule en la parte superior de una emulsión y el agua en la parte inferior. Por lo tanto, las gotas en una emulsión de aceite en agua tienden a generar una fase crema, mientras que las de una emulsión de agua en aceite tienden a sedimentar. Se suele considerar que la separación gravitacional tiene un efecto adverso sobre la calidad de las emulsiones alimentarias. Un consumidor espera ver un producto que parece homogéneo y, por lo tanto, no es deseable la separación de una emulsión en una capa rica en gotas ópticamente opaca y una capa empobrecida en gotas menos opaca. Sin embargo, se debe considerar la estrategia que se utiliza en un extenso número de alimentos líquidos, que beneficiados por la reversibilidad del proceso de cremado, pueden comercializarse utilizando frases como “*Agítese antes de usar*”.

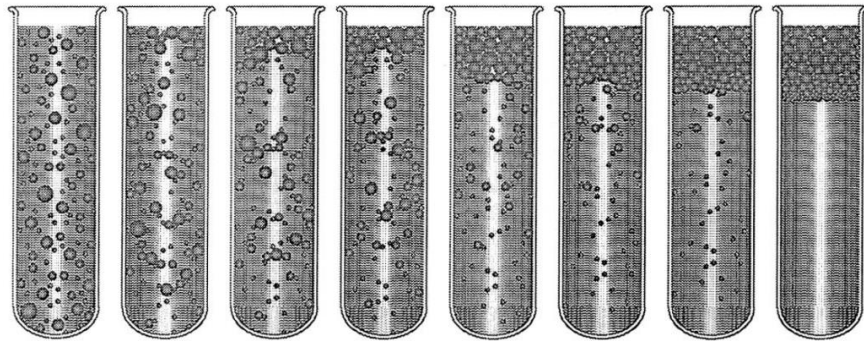


Figura 1.5. Dependencia del tiempo de la cinética de cremado en emulsiones. Las gotas se mueven hacia arriba hasta que no pueden moverse más y forman una “fase crema” (McClements, 1999).

1.5.7.2 Floculación

Las gotas en las emulsiones están en continuo movimiento debido a los efectos de la energía térmica, la gravedad o las fuerzas mecánicas aplicadas y a medida que se mueven, chocan con frecuencia con sus vecinas (Lips et al., 1993, Dukhin y Sjoblom, 1996). Después de una colisión, las gotas de emulsión pueden separarse o permanecer agregadas, según la magnitud relativa de las interacciones atractivas y repulsivas entre ellas. Los dos tipos principales de agregación en las emulsiones alimentarias son la floculación y la coalescencia (Dickinson y Stainsby 1982; Dickinson, 1992; Walstra, 1996a, b). La floculación es el proceso mediante el cual dos o más gotas de fase dispersa se unen para formar un agregado en el que dichas gotas retienen su integridad individual, mientras que la coalescencia es el proceso mediante el cual dos o más gotas se fusionan para formar una sola gota más grande.

La floculación de las gotas puede ser ventajosa o perjudicial para la calidad de la emulsión dependiendo de la naturaleza del producto alimenticio. La floculación acelera la velocidad de separación gravitacional en emulsiones diluidas, lo cual no es deseable porque reduce su vida útil (Luyten et al., 1993). También provoca un aumento pronunciado de la viscosidad de la emulsión e incluso puede conducir a la formación de un gel (Demetriades et al., 1997a, b). Se espera que algunos productos alimenticios tengan una viscosidad baja y, por lo tanto, la floculación es perjudicial. En otros productos, una cantidad controlada de floculación puede ser ventajosa porque conduce a la creación de una textura deseable. Por lo tanto, las mejoras en la calidad de los

productos alimenticios a base de emulsión dependen de una mejor comprensión de los factores que determinan el grado de formación de flóculos, la estructura de los flóculos formados y la velocidad a la que procede este fenómeno de desestabilización. Además, es importante comprender el efecto que tiene la floculación sobre las propiedades fisicoquímicas de las emulsiones.

1.5.7.3 Coalescencia

La coalescencia es el proceso mediante el cual dos o más gotas de líquido se fusionan para formar una sola gota más grande (**Figura 1.6**). Es el mecanismo principal por el cual una emulsión se mueve hacia su estado más estable termodinámicamente porque implica una disminución en el área de contacto entre las fases de aceite y agua. La coalescencia hace que las gotas de emulsión crezcan o sedimenten más rápidamente debido al aumento de su tamaño. En las emulsiones de aceite en agua, la coalescencia eventualmente conduce a la formación de una capa de aceite en la parte superior del material, lo que se conoce como “*oiling off*”. En las emulsiones de agua en aceite, este fenómeno conduce a la acumulación de agua en el fondo del material. Por estas razones, la comprensión de los factores que influyen en la coalescencia es importante para los fabricantes de alimentos que intentan crear productos con una vida útil prolongada.

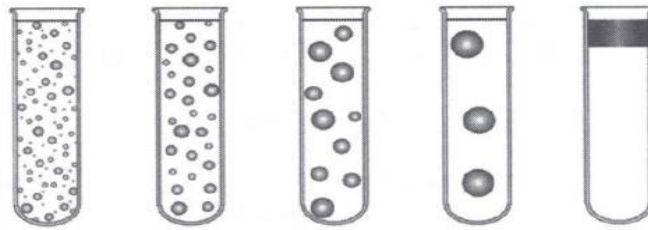


Figura 1.6. La coalescencia de las gotas conduce finalmente a la separación completa de las fases oleosa y acuosa (McClements, 1999).

1.5.7.3.1' Coalescencia parcial

La coalescencia parcial ocurre cuando dos o más gotas de aceite parcialmente cristalinas entran en contacto y forman un agregado de forma irregular (**Figura 1.7**). El agregado conserva en parte la forma de las gotas a partir de las cuales se formó porque la red de cristales gruesos dentro de las gotas evita que se fusionen por completo (Mulder y Walstra, 1974, Boode, 1992, Dickinson y McClements, 1995, Walstra, 1996a). La coalescencia parcial es particularmente importante en los productos lácteos, porque los glóbulos de grasa de la leche son parcialmente cristalinos en un rango bastante amplio de temperaturas (Mulder y Walstra, 1974, Walstra y van Beresteyn, 1975). La aplicación de fuerzas de cizallamiento o ciclos de temperatura a la crema que contiene glóbulos de grasa láctea parcialmente cristalinos puede causar una coalescencia parcial, lo que conduce a un marcado aumento de la viscosidad ("espesamiento") y posterior separación de fases (Van Boekel y Walstra, 1981, Boode, 1992).

La coalescencia parcial es un proceso esencial en la producción de helado, aderezos batidos, mantequilla y margarina (Dickinson y Stainsby 1982; Goff et al. 1987; Barford y Krog, 1987; Barford et al., 1987; Moran, 1994). Las emulsiones de aceite en agua se enfrían a una temperatura en la que las gotas son parcialmente cristalinas y se aplica una fuerza de cizallamiento que conduce a la agregación de las gotas por coalescencia parcial (Mulder y Walstra, 1974). En la mantequilla y la margarina, la agregación da como resultado una inversión de fase (Moran, 1994), mientras que en el helado y la crema batida, las gotas de grasa agregadas forman una red que rodea las celdas de aire y proporciona la resistencia mecánica necesaria para producir una buena estabilidad y textura (Barford et al., 1987, Goff, 1993).

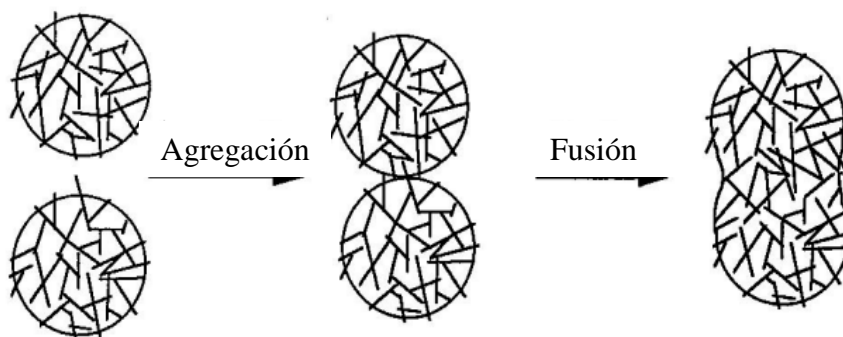


Figura 1.7. La coalescencia parcial se produce entre dos gotas que son parcialmente cristalinas cuando un cristal de una gota penetra en la porción líquida de otra gota (McClements, 1999).

1.5.7.4 Inversión de fases

La inversión de fase es el proceso mediante el cual un sistema cambia de una emulsión de aceite en agua a una emulsión de agua en aceite o viceversa (**Figura 1.8**). La inversión de fases es un paso esencial en la fabricación de varios productos alimenticios importantes, como la mantequilla y la margarina (Mulder y Walstra, 1974, Dickinson y Stainsby, 1982, Moran, 1994). Sin embargo, en otros alimentos, la inversión de fase no es deseable para la mayoría de las emulsiones alimentarias, porque tiene un efecto adverso sobre su apariencia, textura, estabilidad y sabor.

- Base física de la inversión de fase

La inversión de fase generalmente se desencadena por alguna alteración en la composición o las condiciones ambientales de una emulsión (por ejemplo, fracción de volumen de fase dispersa, tipo de emulsionante, concentración de emulsionante, condiciones de solvente, temperatura o agitación mecánica) (Shinoda y Friberg, 1986, Dickinson, 1992, Campbell et al., 1996). Solo ciertos tipos de emulsiones son capaces de sufrir una inversión de fase, en lugar de descomponerse completamente en sus fases componentes. Estas emulsiones pueden existir en un estado cinéticamente estable después de que haya tenido lugar la inversión de fase. Normalmente es necesario agitar la emulsión durante el proceso de inversión de fase.

Se cree que la base fisicoquímica de la inversión de fase es extremadamente compleja e involucra aspectos de floculación, coalescencia, coalescencia parcial y

formación de emulsión. En el punto en el que se produce la inversión de fase, que a menudo se denomina "punto de equilibrio", el sistema puede contener regiones de emulsión de aceite en agua, emulsión de agua en aceite, emulsión múltiple y fases bicontinuas.

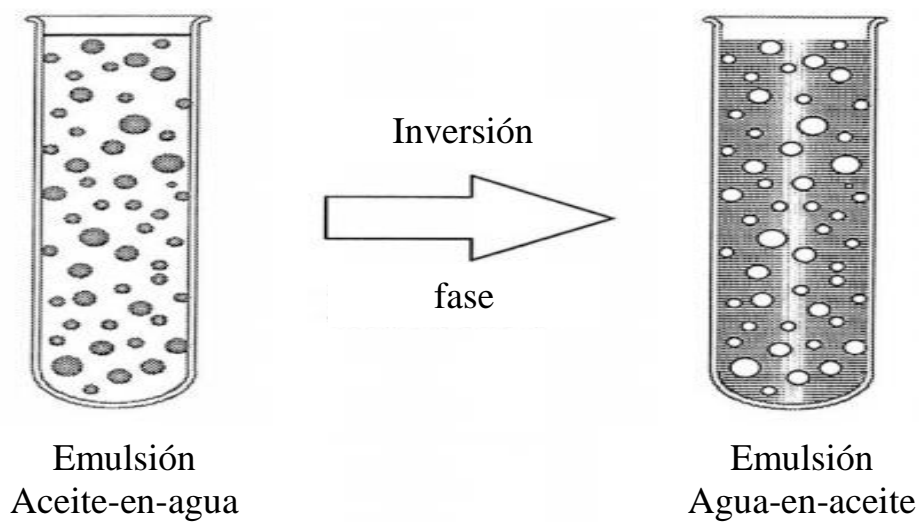


Figura 1.8. La inversión de fase implica la conversión de una emulsión aceite en agua en una emulsión agua en aceite o viceversa (McClements, 1999).

1.5.7.5 Maduración de Ostwald

La maduración de Ostwald es el proceso por el cual las gotas grandes crecen a expensas de las más pequeñas debido al transporte másico de la fase dispersa de una gota a otra a través de la fase continua intermedia (**Figura 1.9**) (Kabalnov y Shchukin, 1992, Taylor, 1995). Es insignificante en la mayoría de las emulsiones alimentarias porque las

solubilidades mutuas de los triacilgliceroles y el agua son tan bajas que la velocidad de transporte de masa es insignificante (Dickinson y Stainsby, 1982). No obstante, puede ser importante en emulsiones de aceite en agua que contienen más lípidos solubles en agua (por ejemplo, los aceites aromatizantes o los licores de crema). En este tipo de sistema, el fabricante de alimentos debe tener que considerar métodos para retrasar la tasa de maduración de Ostwald.

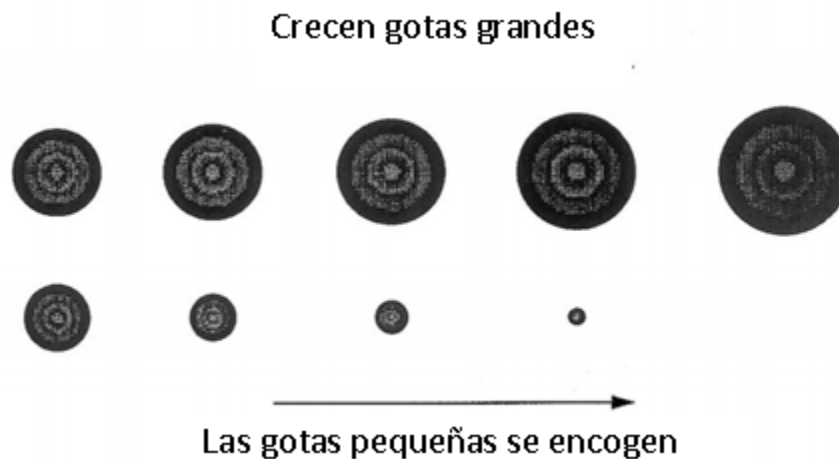


Figura 1.9. La maduración de Ostwald implica el crecimiento de gotas grandes a expensas de las más pequeñas (McClements, 1999).

La tasa de maduración de Ostwald aumenta a medida que disminuye el tamaño promedio de las gotas en una emulsión porque la solubilidad de la fase dispersa aumenta con el radio decreciente. La tasa inicial también aumenta a medida que aumenta el ancho de la distribución del tamaño de las partículas (Kabalnov y Shchukin, 1992). Por lo tanto, la maduración de Ostwald se puede retrasar asegurándose de que una emulsión tenga una distribución de tamaño de gota estrecha y que las gotas sean bastante grandes. No

obstante, puede haber otros problemas asociados con la presencia de gotas relativamente grandes en una emulsión, tales como formación de crema, floculación o coalescencia acelerada.

1.5.8' Distribución de tamaño de partículas o gotas

Propiedades de gran importancia en las emulsiones tales como la estabilidad a largo plazo, la apariencia y la textura están íntimamente ligadas con el tamaño de las gotas de fase dispersa que contienen. Las emulsiones alimentarias son generalmente polidispersas, es decir, el tamaño de todas las gotas varía dentro de un rango definido. Si todas las gotas en una emulsión son del mismo tamaño, la emulsión se denomina monodispersa, pero si hay una gama de tamaños presentes, la emulsión se denomina polidispersa. El tamaño de las gotas en una emulsión monodispersa se puede caracterizar completamente por un solo número, como el diámetro de la gota (d) o el radio (r) (Palazolo, 2006).

Las emulsiones monodispersas se utilizan a veces para estudios fundamentales porque la interpretación de las medidas experimentales es mucho más simple que la de las emulsiones polidispersas. No obstante, las emulsiones alimentarias siempre contienen una distribución de tamaños de gotas. Idealmente, es importante tener información sobre la distribución completa del tamaño de partícula de una emulsión (es decir, el tamaño de cada una de las gotas en el sistema). Sin embargo, en muchas situaciones, el conocimiento del tamaño promedio de las gotas y el ancho de la distribución es suficiente (Hunter, 1986).

La distribución de tamaño de partículas puede representarse como una curva continua: la función de distribución $F(D_i)$. La función de distribución en número $F_n(D_i)$ se genera de manera tal que el área bajo la curva en el rango de dos diámetros D_i y $D_i + dD_i$ es igual al número de partículas en dicho rango, n_i , de manera tal que $n_i = F(D_i) \cdot dD_i$. A partir del mismo razonamiento pueden generarse las correspondientes funciones de distribución en superficie $F_s(D_i)$ **Ec. 1.4** y en volumen $F_v(D_i)$, **Ec. 1.5** asumiendo que las emulsiones están formadas por gotas esféricas (Rawle, 2005):

$$F_v(D_i) = (1/6) \cdot \pi \cdot D_i^3 \cdot F_n(D_i) \text{ (Ec. 1.4)}$$

$$F_s(D_i) = \pi \cdot D_i^2 \cdot F_n(D_i) \text{ (Ec. 1.5)}$$

La **Figura 1.10** muestra un ejemplo de distribuciones en número, superficie y volumen para una emulsión O/W (Palazolo, 2006).

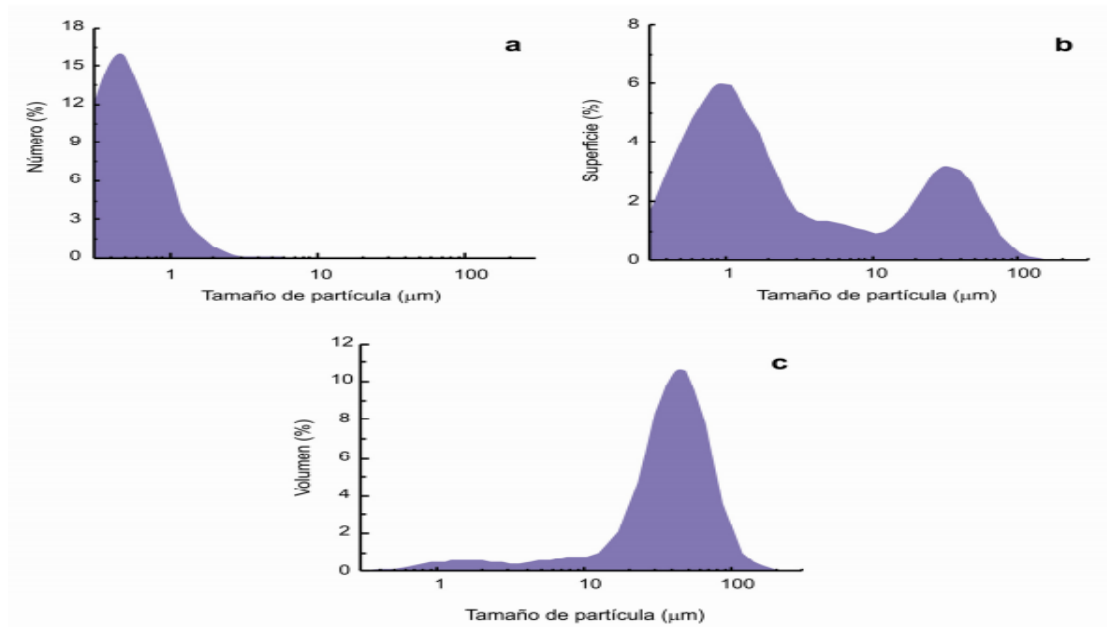


Figura 1.10. Distribuciones de tamaño de partícula para una emulsión aceite en agua (O/W) en: a) número, b) superficie y c) volumen (Palazolo, 2006).

A partir de las funciones de distribución pueden calcularse los distintos diámetros promedio:

$$D[1,0] = \frac{\sum n_i x D_i}{\sum n_i} = \frac{\sum n_i x D_i}{N} \text{ (Ec. 1.6)}$$

$$D[2,0] = \frac{\sum n_i x D_i^2}{\sum n_i} = \frac{\sum n_i x D_i^2}{N} \text{ (Ec. 1.7)}$$

$$D[3,0] = \frac{\sum n_i x D_i^3}{\sum n_i} = \frac{\sum n_i x D_i^3}{N} \text{ (Ec. 1.8)}$$

$$D[3,2] = \frac{\sum n_i x D_i^3}{\sum n_i x D_i^2} \text{ (Ec. 1.9)}$$

$$D[4,3] = \frac{\sum n_i x D_i^4}{\sum n_i x D_i^3} \text{ (Ec. 1.10)}$$

La determinación de los diámetros promedio $D[1,0]$ (en número) (**Ec. 1.6**), $D[2,0]$ (en superficie) (**Ec. 1.7**) y $D[3,0]$ (en volumen) (**Ec. 1.8**) requieren el conocimiento del número total de gotas. No obstante, puede prescindirse de dicha información mediante la utilización del diámetro promedio de Sauter ($D[3,2]$) (**Ec. 1.9**) y del diámetro promedio de De Brouker ($D[4,3]$) (**Ec. 1.10**), cuyas fórmulas no contienen el número total de gotas. Los valores de $D[3,2]$ y $D[4,3]$ se relacionan con las distribuciones en superficie y volumen, respectivamente. Estos diámetros se conocen como “moment diameters” e introducen otro término lineal en el diámetro, de manera que en el numerador el término superficial tiene una dependencia con D^3 y el volumen con D^4 (Walstra, 1983; Rawle, 2005).

Junto con el tamaño de la gota, el ancho de la distribución del tamaño de la gota también es muy importante en términos de estabilidad y aplicación efectiva. Las propiedades de dos emulsiones pueden variar entre sí, cuando las dos tienen diferentes anchos de distribución, incluso cuando el tamaño medio de las gotas es el mismo. La extensión de una distribución se puede describir como:

$$Span = \frac{d(90)-d(10)}{d(50)} \text{ (Ec. 1.11)}$$

Donde, el decil inferior es $d(10)$, el valor mediano $d(50)$ y el decil superior $d(90)$.

La determinación de tamaño de partícula debe hacerse en condiciones de alta dilución ($\phi < 0,05$) y con agitación, con el objetivo de que las gotas se distribuyan de manera uniforme. Así, un volumen pequeño de la emulsión se coloca en un recipiente con agua y un haz de radiación láser incide sobre una celda interna transparente por donde recircula la emulsión diluida. La luz dispersada en distintos ángulos por gotas de diferente tamaño pasa por un complejo sistema óptico e incide posteriormente sobre un arreglo de detectores obteniendo un patrón angular de luz dispersada. El *software* incorporado en el equipo permite traducir este patrón en la correspondiente distribución de tamaño de partícula (McClements, 1999).

1.5.9' Evaluación de la estabilidad de una emulsión por dispersión múltiple de luz

La dispersión de luz estática se usa para determinar tamaños de partículas entre aproximadamente 0,1 y 1000 μm y, por lo tanto, es adecuada para caracterizar las gotas en la mayoría de las emulsiones alimentarias. Cuando un rayo de luz se dirige a través de una emulsión, es dispersado por las gotas (Dickinson y Stainsby, 1982, Farinato y Rowell, 1983, Hiemenz, 1986, Hunter, 1986, Everett, 1988). El conocimiento de la distribución del tamaño de las gotas permite predecir la influencia de las gotas en la dispersión de la luz, por lo tanto, en la turbidez de una emulsión (Hernández y Baker, 1991). Puede utilizarse una medida del grado de dispersión para proporcionar información sobre la distribución y concentración del tamaño de las gotas. Los

instrumentos analíticos basados en este principio han estado disponibles comercialmente durante muchos años (Mikula, 1992) y se utilizan ampliamente en la industria alimentaria con fines de análisis y/o investigación.

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

El análisis de los perfiles de T% y BS% permite evaluar la cinética de los distintos mecanismos de desestabilización de emulsiones (por ejemplo, cremado y coalescencia) si

se elige adecuadamente la zona del tubo (Pan et al., 2002). En este sentido, el BS% es el parámetro más utilizado y depende tanto de la fracción volumétrica (o másica) de la fase dispersa como del diámetro (D) de partículas, es decir $BS\% = f(\phi, D)$. El BS% se incrementa tanto con el aumento de ϕ (o ϕ_m) como la disminución de D. En cambio, si el BS% sólo disminuye en la parte inferior de la celda y el perfil se desplaza hacia la parte superior de la misma, el resultado es consistente con un proceso de cremado. En este caso, la disminución de BS% en la parte inferior de la celda se atribuye a una disminución de ϕ ; al mismo tiempo, el aumento de BS% en la parte superior de la celda se atribuye a la formación de una emulsión más concentrada, la fase crema, de mayor ϕ . En sistemas reales, los procesos de cremado y coalescencia pueden ocurrir en forma simultánea, por lo que la variación temporal de los perfiles de BS% es más compleja (Henaó, 2021).

1.6'Objetivos

1.6.1' Objetivo general

- Obtener fracciones con alto contenido en polisacáridos insolubles (okara e ISPS) a partir de residuos industriales de la soja, evaluando su aplicación como agentes emulsificantes en el desarrollo de emulsiones O/W.

1.6.2' Objetivos específicos

- Evaluar la aplicación de técnicas de ultrasonido de alta energía, para modificar las propiedades composicionales, morfológicas y funcionales de las fracciones de okara e ISPS de soja.

- Analizar las propiedades emulsificantes de las fracciones obtenidas en la formulación de emulsiones O/W en diferentes condiciones de procesamiento comúnmente utilizadas por la industria de los alimentos (pH, agregado de sales).

- Definir las mejores condiciones de proceso evaluadas anteriormente para el desarrollo de agentes emulsificantes con alto contenido en polisacáridos insolubles de soja con potencial para su aplicación en el desarrollo de emulsiones alimentarias O/W.

Capítulo 2

Obtención, caracterización y propiedades funcionales de fracciones derivadas de la harina de soja desgrasada (okara y polisacáridos insolubles de soja)

2.1 Okara de soja

Okara es un término general utilizado para denominar diferentes subproductos insolubles generados durante la producción de derivados de soja como el tofu y la leche de soja, entre otros. Aproximadamente, 1,1-1,2kg de okara húmedo se producen a partir de 1,0kg de soja destinado para la producción de leche de soja y tofu (Fayaz et al., 2019). El okara seco, dependiendo su origen, puede ser rico en fibra dietaria total (25-57%) y proteínas (23-63%), así como en una cantidad considerable de minerales, oligoelementos, saponinas, isoflavonas y otros nutrientes (Moscoso Ospina et al., 2022).

En esta investigación, el okara de soja es generado como el residuo insoluble resultante de una extracción alcalina sobre la harina desgrasada de soja, utilizando la tecnología de ultrasonido de alta frecuencia antes y después de dicha extracción, dando como resultado la obtención de nuevas fracciones de okara. Este tipo de okara representa, en condiciones normales de extracción, aproximadamente el 40% de los sólidos de la mencionada harina (Moscoso Ospina et al., 2022).

El okara de leche de soja se ha estudiado como fuente de fibra dietética en los alimentos y como agente emulsificante debido a su importante contenido de proteínas y polisacáridos (Li et al., 2012). No obstante, no existían previos a este trabajo de investigación, estudios intensivos sobre la aplicabilidad del okara producto de la extracción alcalina de proteínas de reserva. Cabe resaltar que todavía estos subproductos

se consideran como un producto de desecho o un alimento para animales de bajo valor agregado.

2.1.1 Polisacáridos solubles de soja

El polisacárido soluble de soja (SSPS) es un polisacárido obtenido luego de someter a la harina de soja a dos extracciones, una alcalina (residuo insoluble) y otra ácida a elevada presión y temperatura (residuo soluble). La técnica de extracción patentada por la empresa Fuji Oil es muy eficiente para diversas variedades de SSPS que difieren en sus propiedades físicas y funcionalidades (Maeda y Nakamura, 2009). La mencionada empresa ha comercializado SSPS bajo la marca 'SOYAFIBE-S' desde 1993. Adicionalmente, diversos trabajos han analizado las diferencias en la composición de SSPS en función de los cambios en el proceso de extracción (Morita, 1965; Yoshi et al., 1996; Furuta et al., 1998).

El SSPS se compone principalmente de la fibra dietaria del cotiledón de soja y genera soluciones acuosas con baja viscosidad y alta estabilidad. El SSPS puede cumplir con diversas funciones, tales como agente de dispersión, estabilización, emulsificación y/o adhesión. Por lo tanto, este material puede no solo usarse como materia prima para aumentar el contenido de fibra de los alimentos, sino también como agente tecnofuncional para el desarrollo de diversas matrices alimentarias.

2.1.2 Polisacáridos insolubles de soja

Los polisacáridos insolubles de soja (ISPS) surgen a partir de la utilización del precipitado insoluble generado luego de la extracción ácida que permite la producción del polisacárido solubles de soja (SSPS) como material soluble (Fuji et al., 2010). Actualmente, no hay suficientes fuentes en la literatura específicas sobre la mencionada fracción insoluble, y tampoco un análisis profundo del efecto de diferentes procesos de extracción sobre sus características composicionales y/o tecnofuncionales.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Materiales

Los copos desgrasados de soja fueron cedidos por la empresa Terminal 6 S.A. (Santa Fe, Argentina). Todos los reactivos químicos empleados en este trabajo fueron de calidad analítica.

2.2.1.1 Harina desgrasada de soja

Los copos desgrasados de soja fueron triturados en un molino de cuchillas (FW 100 model, AJI) y tamizados hasta un tamaño de partícula menor a 150 μ m, dando como resultado la harina desgrasada de soja.

2.2.2' Extracción de okara

La harina desgrasada de soja se hidrató en agua destilada en relación harina:agua (1:11m/V), ajustando a pH 9,0 con NaOH 4N. Dicha dispersión se llevó a un proceso de homogeneización en un equipo tipo rotor-estator (Ultraturrax T-25, herramienta de dispersión S25-18G, IKA Labortechnik, GmbH& Co, Staufen, Alemania) a 12000rpm durante un minuto y se incubó a 65°C durante 35 minutos. Después de esto, las dispersiones fueron centrifugadas a 7000xg por 15 minutos a 4°C obteniendo una fracción insoluble húmeda (okara húmedo) que, previo una serie de lavados con 2-propanol, se secó en estufa de aire forzado (40°C) (Maeda, 2000). En consecuencia, el residuo seco se denominó okara (OK). Posteriormente, se realizó una variante sobre el proceso de obtención sometiendo la dispersión alcalina a un tratamiento de ultrasonido (Sonics VibraCells, 75% potencia, 10 minutos, 15s ON, 15s OFF) pre y pos extracción alcalina, obteniendo como resultado las fracciones S-OK y OK-S, respectivamente

Figura 2.1.

2.2.2.1' Extracción de polisacáridos insolubles de soja (ISPS)

La obtención de fracciones enriquecidas en polisacáridos insolubles de soja (ISPS) se obtuvieron adaptando el método propuesto por Fuji et al. (2010). Luego de las respectivas extracciones alcalinas y de obtener los diferentes okaras húmedos (OKh, S-OKh, OKh-S), los mismos se rehidrataron nuevamente con agua destilada en relación

Obtención, caracterización y propiedades funcionales de fracciones derivadas de la harina de soja desgrasada

okara:agua (1:4m/V). Estas dispersiones fueron ajustadas a pH 3,0 con HCl 2N, se homogeneizaron en un equipo rotor estator (12000rpm, 1min) y fueron sometidas a un tratamiento térmico con autoclave (1atm, 120°C, 90min). Seguidamente, fueron centrifugadas (7000xg por 15 minutos a 4°C), descartando el sobrenadante soluble que contiene el SSPS (Fuji et al., 2010). Los precipitados insolubles fueron tratados a partir del método descrito por Porfiri et al. (2017), luego de los lavados con 2-propanol, y un secado en estufa de aire forzado (40°C). Siguiendo la nomenclatura dada a los okaras, estos tratamientos permitieron la obtención de las fracciones S-ISPS, ISPS y ISPS-S

Figura 2.2.

Obtención, caracterización y propiedades funcionales de fracciones derivadas de la harina de soja desgrasada

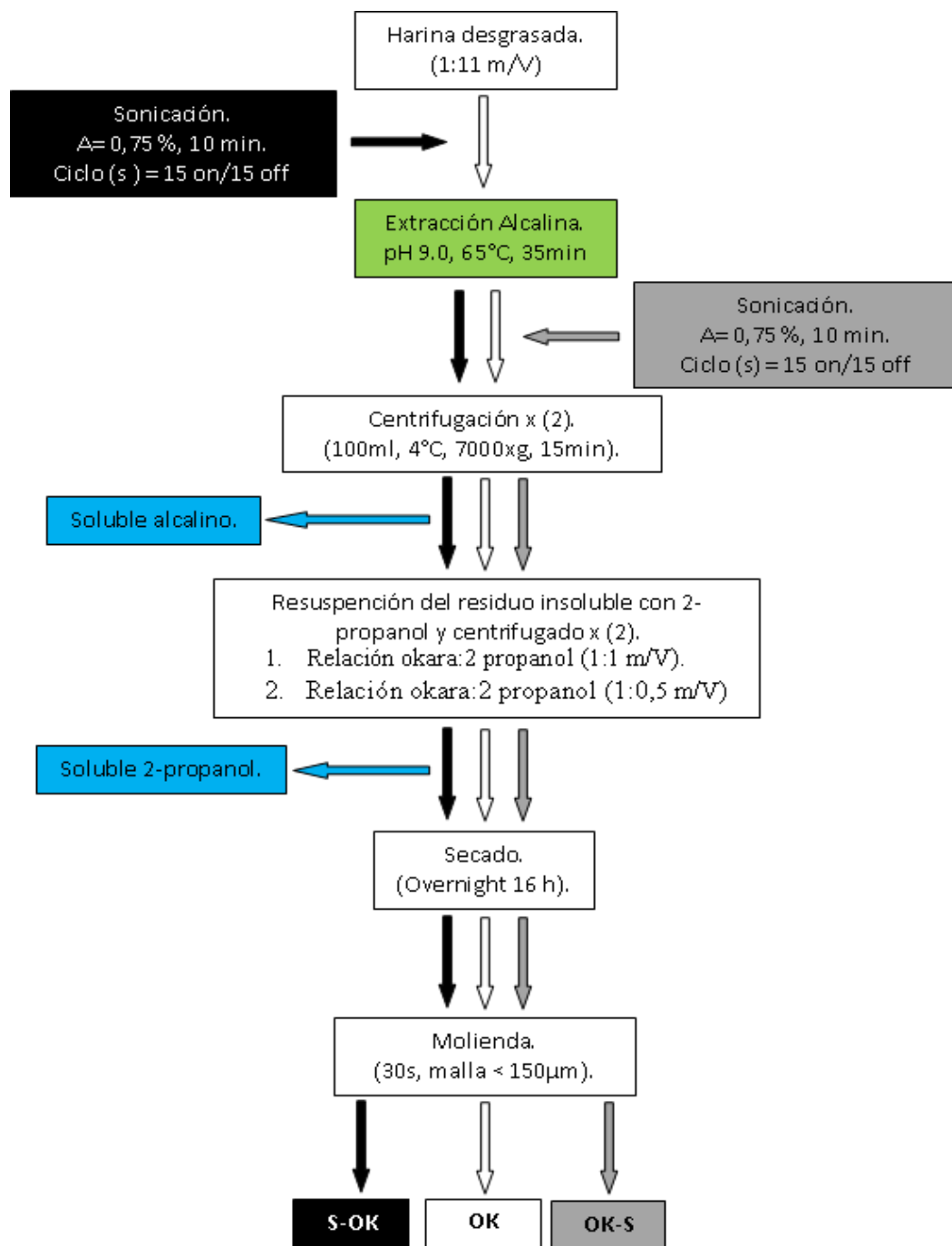


Figura 2.1. Diagrama de obtención de las diferentes fracciones de okara de soja.

Obtención, caracterización y propiedades funcionales de fracciones derivadas de la harina de soja desgrasada

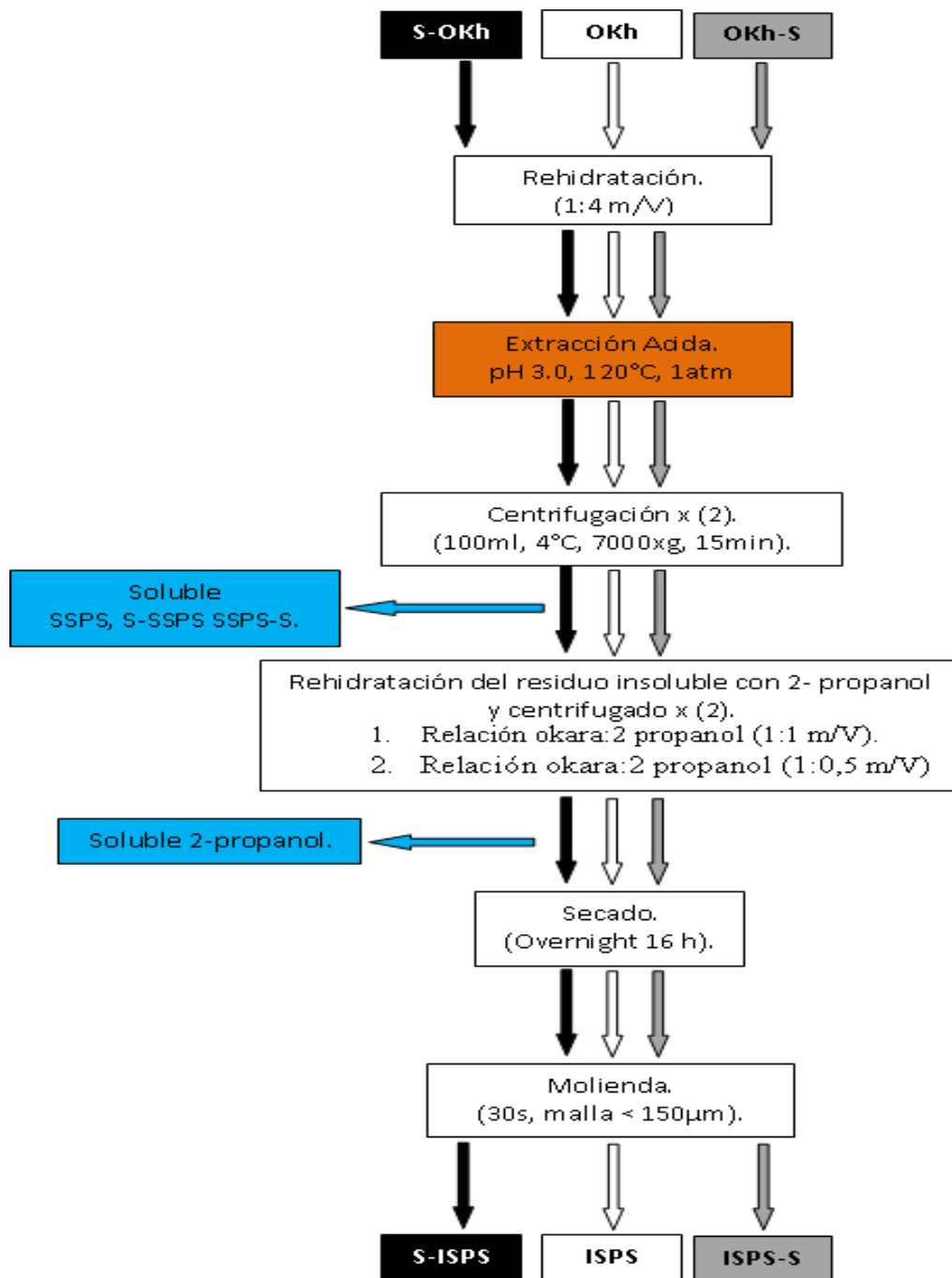


Figura 2.2. Diagrama de obtención de las diferentes fracciones de polisacáridos insolubles de soja (ISPS).

2.2.2.2 Rendimiento de extracción

Los rendimientos de extracción de las diferentes fracciones de okara e ISPS se calcularon mediante la **Ecuación 2.1**. Este parámetro es el resultado de la masa final recuperada en la extracción con respecto a la masa inicial de harina desgrasada de soja, expresado como porcentaje.

$$\text{Rendimiento (\% m/m)} = \frac{\text{masa de fracción recuperada (g)}}{\text{Harina desgrasada de soja (g)}} \times 100 \text{ (Ec. 2.1)}$$

2.3 Caracterización fisicoquímica

2.3.1 Determinación de humedad

Los contenidos de humedad de los okara e ISPS se calcularon como la pérdida de peso por evaporación de agua, luego de un tratamiento a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ por 2 horas utilizando una estufa con circulación forzada de aire a presión atmosférica (Kirk et al., 1996; AOAC International, 1990). Para ello, se utilizaron cajas de Petri con un contenido inicial de muestra de 5g.

2.3.2' Determinación del contenido de cenizas

Para esta determinación, se pesaron aproximadamente 4g de muestra en cada crisol. Posteriormente, se carbonizó dicha muestra con un mechero en la campana de extracción hasta que no se desprendían vapores humeantes, y se llevaron a una mufla a 550°C hasta obtener un residuo sin restos carbonosos (Kirk et al., 1996; AOAC International, 1990).

2.3.3' Determinación del contenido de proteínas

El contenido proteína bruta se determinó por el método de Kjeldahl utilizando el factor de conversión $N \times 6,25$. Este procedimiento consta de tres etapas. (1) Digestión; en la cual se agrega una cantidad adecuada de ácido sulfúrico para aumentar el punto de ebullición y un catalizador para acelerar la reacción, tal como sulfato de cobre. (2) Destilación; donde el $(NH_4)_2SO_4$ formado se libera como NH_3 en medio alcalino y se transporta con ayuda de una destilación por arrastre con vapor de agua a un recipiente que contiene una solución acuosa diluida de H_3BO_3 . (3) Titulación; en esta etapa se valora directamente el amoníaco retenido con un ácido normalizado como HCl 0,1N (AOAC International, 1990). En general, el procedimiento de referencia Kjeldahl determina la materia nitrogenada total, que incluye tanto las proteínas como diversos compuestos nitrogenados de naturaleza no proteica (Pearson, 1998).

2.3.4' Electroforesis

La composición polipeptídica de las fracciones de okara e ISPS se obtuvieron empleando un equipo Biorad Miniprotean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories Inc., EE. UU). Los geles poliacrilamida se obtuvieron en condiciones reductoras y no reductoras utilizando como agente tensioactivo el SDS. El SDS es un detergente que desnaturaliza las estructuras secundarias y terciarias no unidas por puentes disulfuro y las recubre con una carga negativa que se correlaciona con su longitud, lo que permite estimar los pesos moleculares de las estructuras polipeptídicas presentes. La movilidad a través del gel puede verse afectada por el estado de la proteína (por ejemplo, fosforilación y presencia de moléculas multiméricas) (Brunelleet al., 2014).

El sistema Laemmli SDS-PAGE (Laemmli, 1970), es un gel discontinuo con un gel de Stacking o apilamiento superior y un gel de resolución inferior que tienen diferentes valores de pH y concentraciones de poliacrilamida. El gel de apilamiento superior tiene un porcentaje más bajo de poliacrilamida, lo que permite que las proteínas se muevan rápidamente y se "apilen" en una banda apretada antes de entrar en el gel de resolución, con mayor porcentaje de poliacrilamida, para facilitar la separación. Los porcentajes de poliacrilamida se pueden optimizar según el rango de tamaño de las moléculas presentes en la muestra.

2.3.4.1 Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron de grado electroforesis. Se utilizó N, N' - metilenbisacrilamida, tris (hidroximetil) aminometano (Tris), persulfato de amonio (APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$), N, N, N', N - tetrametiletilendiamina (TEMED), glicerol, dodecilsulfato de sodio (SDS, 99% de pureza), β -mercaptoetanol (β -ME), Coomassie Brilliant Blue R-250 y azul de bromofenol. Las proteínas incluidas en los marcadores de peso molecular fueron: fosforilasa b (92kDa), BSA (66kDa), ovoalbúmina (45kDa), anhidrasa carbónica (29kDa), KTI (20,1kDa) y α -lactoalbúmina (14,4kDa).

Adicionalmente, se prepararon las siguientes soluciones:

- a) Buffer de gel separador 4X: Se disolvieron Tris-HCl 1.5 M (18,13g), pH 8,8 y SDS extra puro > 99% (0,4g) en 70ml de agua bidestilada. Se reajustó el pH a 8,8 con HCl y se llevó a volumen final de 100ml en un matraz.
- b) Buffer de stacking 4X o buffer de gel apilador: Se disolvieron Tris-HCl, 0,37M (2,24g), pH 6,8 y SDS extra puro > 99% (0,2g) en 30ml de agua bidestilada y se reajustó a un pH de 6,8 con HCl en un volumen final de 50ml (matraz).
- c) Buffer de muestra 2X desnaturalizante, para 50ml se utilizaron las siguientes proporciones: 25% m/V glicerol (12,5ml), 0,1% m/V azul de bromofenol (50mg), 4% SDS (2,0g) (opcional β -mercaptoetanol).
- d) Buffer de corrida 5X: Se disolvieron Tris Base 0,125M (7,5g), glicina 1M (37,5g) y SDS extra puro > 99% (2,5g) en 300ml de agua destilada ajustando a pH 8.3

Obtención, caracterización y propiedades funcionales de fracciones derivadas de la harina de soja desgrasada

- con HCl. Se llevó a volumen final de 500ml. Nota: se debe diluir 1:5 con agua destilada para su uso.
- e) Solución de APS 10% m/V. Se preparó disolviendo la sal en agua bidestilada y se utilizó inmediatamente después de su preparación.
 - f) Solución colorante: Coomassie Brilliant Blue R-250 0,192% m/V en una mezcla de agua/metanol/ácido acético (proporción volumétrica 10:10:4).
 - g) Solución decolorante: Mezcla de etanol/agua/ácido acético (proporción volumétrica 25:20:5).

2.3.4.2 Preparación de los geles

Se prepararon geles de 1,5mm de espesor a una concentración de 12% m/V y 4% m/V acrilamida-bisacrilamida para los geles separador y apilador, respectivamente. El gel separador se preparó mezclando bajo agitación magnética, adicionando acrilamida al 30,8% (10,92ml), buffer del gel separador 4X (7ml), agua bidestilada (10ml), TEMED (30 μ l) y por último se adicionó persulfato de amonio NH_4 (100 μ l). En la parte superior del gel se agregó cuidadosamente 1,0ml de una solución etanol/agua 1:1 V/V para minimizar la difusión del oxígeno al gel durante la polimerización, la cual se realizó a 8°C durante 15min.

Para la elaboración del gel apilador o de stacking, se adicionaron acrilamida al 30,8% (1,06ml), buffer de stacking 4X (2,0ml), agua bidestilada (5ml), TEMED (16 μ l), y

persulfato de amonio (60 μ l) Posteriormente, se colocaron los peines de stacking y se llevó a 8°C durante 15min hasta la polimerización. Las proporciones anteriormente mencionadas equivalen a 2 geles con un espesor de 1,5mm.

2.3.4.3' Preparación de las muestras

En primer lugar, se pesó una cantidad de concentrado para garantizar la siembra de 15 μ g de proteína por calle, de acuerdo con el contenido de proteína bruta (**Tabla 2.1 y 2.2**). Los concentrados se disolvieron en 1ml de buffer de muestra en presencia y ausencia de β -ME, se agitaron en un vortex y se trataron térmicamente en un baño de agua a 100°C durante 5min. Luego, se enfriaron en un baño de agua a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 10.000 \times g durante 10min a 20°C empleando una centrífuga Hermle modelo 129-Z200 (Wehningen, Alemania). Las proteínas usadas como patrones de peso molecular sección **2.3.4.1** se utilizaron en forma directa, sin preparación previa, de acuerdo con las indicaciones dadas por el proveedor.

2.3.4.4' Condiciones de corrida, coloración, decoloración y revelado de los geles

Se sembraron 10 μ L de muestras (15 μ g proteína) y el patrón de peso molecular y las corridas electroforéticas se realizaron a un amperaje constante de 12mA por placa. Los geles se tiñeron con la solución colorante durante 2h y se decoloraron con la solución decolorante, con recambios constantes de la misma hasta completar una eficiente

decoloración. Las imágenes de los geles se obtuvieron mediante una cámara fotográfica con lentes de 48MP, 8MP, 5MP y 5MP y se procesaron empleando el software IMAGE J.

2.3.4.5 Pruebas adicionales de disociación proteica para fracciones ISPS

Para las fracciones de polisacáridos insolubles de soja (ISPS, S-ISPS e ISPS-S), que presentaron problemas en la separación e identificación de bandas, por ello, se realizaron pruebas de disociación de acuerdo al proceso descrito por Zhang et al. (2012), con pequeñas modificaciones. Para dichas pruebas, las suspensiones de polisacáridos se utilizaron a un contenido total de 75mg de proteína total. Se mezclaron utilizando un volumen de 5ml de disolventes que contenían diversos perturbadores o desnaturalizantes proteicos (urea 6,0M, SDS 0,5% m/V, ditioneitol (DTT) 30mM). Las suspensiones generadas se mezclaron bien y se dejaron en reposo por un lapso de 4 horas. Después de esto, la turbidez fue medida a 600nm (Abs 600) en un espectrofómetro UV-visible T60 (PG Instruments; Leicestershire, Reino Unido). Las medidas experimentales se realizaron por triplicado.

2.3.5 Determinación de fibra dietaria total

La determinación de fibra dietaria total se solicitó como servicio técnico en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de los Alimentos (CIDCA, UNLP-CONICET). Se utilizó el método gravimétrico-enzimático oficial de la AOAC

(991.43; AOAC, 1995) aplicado a granos y productos derivados de cereales. Para ello, muestras de okara e ISPS en solución acuosa se sometieron a un proceso de digestión enzimática secuencial mediante α -amilasas (95°C), proteasas (60°C) y amilogucosidasas (65°C). Posteriormente, se trató el digestato enzimático con alcohol para precipitar la fibra dietaria soluble antes de filtrar, el residuo se lavó con alcohol y acetona, se secó y se pesó. El remanente de este proceso se denomina como fibra dietaria total (FDT), previo descuento del contenido de cenizas (2.3.2) y proteínas (2.3.3) de este residuo.

2.3.6 Determinación de azúcares componentes neutros

La determinación se solicitó como servicio técnico al Centro de Investigación en Hidratos de Carbono (CIHIDECAR, UBA-CONICET). Se analizaron por cromatografía gaseosa los alditoles peracetilados correspondientes a los azúcares generados por hidrólisis ácida. La técnica de hidrólisis utilizada es específica para la determinación de material fibrilar (Morrison, 1988). Se utilizó un cromatógrafo gaseoso Hewlett Packard 5890A, equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un integrador HP3395. Se utilizó nitrógeno como gas portador y las corridas se efectuaron con una relación de split 90:1. Se utilizó una columna capilar SP-2330 (Supelco), de 30m de largo, 0,25mm de diámetro interno y 0,20 μ m de espesor de la fase líquida. El flujo del gas portador fue de 1ml/min y la presión en cabeza de columna fue de 15Psi. Se realizó una corrida de

200°C a 230°C con una rampa a 2°C/min. Las temperaturas del inyector y detector fueron de 240°C.

2.3.7 Espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR)

Las muestras sólidas de okara e ISPS fueron analizadas en un espectrofotómetro FTIR (Shimatsu Affinity-1) a temperatura ambiente, equipado con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR-8200HA) con prisma de ZnSe. La región espectral estudiada fue de 4000 a 400 cm^{-1} . Los espectros se obtuvieron mediante la realización de 64 barridos a una resolución de 4,0 cm^{-1} . Los datos fueron procesados con el software IR Solution.

2.3.8 Morfología mediante microscopía electrónica

El ensayo microscópico de los okaras y los ISSP se realizaron en forma conjunta con los técnicos del Servicio de Microscopía Electrónica y Microanálisis (SeMFi-LIMF) de la Facultad de Ingeniería-UNLP. Para el mismo, se utilizó un microscopio FEI Quanta 200 a una presión de 4,14torr y 10°C. Las medidas se realizaron en modo de bajo vacío (LVSEM) a 130Pa. El análisis se realizó tomando micrografías de campos seleccionados al azar a 1000X, 2500X y 5000X de aumento.

2.3.9' Análisis estadístico

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

2.4 Resultados y discusión

2.4.1' Rendimiento y composición fisicoquímica de muestras de okara e ISPS

Los rendimientos de las diferentes fracciones fueron calculados según la **Ec 2.1**. El rendimiento de la fracción de okara sin ser sometido a un tratamiento de sonicación fue de $27,5\% \pm 0,5$, presentando un resultado similar al reportado por Vaccaro et al. (2016). Por otro lado, los okaras sonicados presentaron un rendimiento de $54,5\% \pm 1,4$ para S-OK y $22,5 \pm 1,1$ para OK-S. La **Tabla 2.1** muestra los resultados de los rendimientos y composición de okara. Los componentes mayoritarios de estas fracciones fueron las proteínas y la fibra dietaria, estos en conjunto conforman el 82,6% para OK, 88,6% para S-OK y 81,1% para OK-S, respectivamente. Cabe resaltar que la fracción S-OK presentó un mayor rendimiento y un mayor contenido de proteína ($63,3\%$ m/m). Este aumento en el contenido de proteína bruta puede ser debido a un proceso de

insolubilización y precipitación de ciertas fracciones de las proteínas de reserva, generado a partir del tratamiento ultrasónico. Esta insolubilización puede atribuirse al efecto de la cavitación, que rompería los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas responsables de la estructura intermolecular de las proteínas (Wang et al., 2008; Hu et al., 2013). Además, el desplegamiento de dichas proteínas y la exposición de residuos hidrófobos jugarían un papel esencial en la formación de agregados y la mencionada tendencia a la precipitación (Ma et al., 2019, Moscoso Ospina et al., 2022).

Karki et al. (2010) realizaron este mismo procedimiento con algunas modificaciones, entre ellas, realizaron el tratamiento ultrasónico a pH isoiónico, aproximadamente de 6,2, luego ajustaron el pH a 8,5 con NaOH 2N con posterior calentamiento a baño María de 60°C por 30 minutos. Este tratamiento presentó resultados similares a los observados en el presente trabajo de investigación, reportando similitudes en el contenido proteico (30 y el 40%) y en los rendimientos de la fracción de okara obtenida. Por otro lado, Eze et al. (2022) realizaron extracciones alcalinas en buffer fosfato 0,1M en un rango de pH 9,0 a 12,0, acompañado de un proceso de sonicación, con el fin de investigar la influencia del pH y de un proceso de sonicado sobre la separación de las proteínas de la harina de soja durante un proceso de extracción alcalina. De acuerdo con estos autores, podría generarse una mayor insolubilización de algunas unidades proteicas de la soja a pH altos adicionando un proceso de sonicación al proceso, recuperando un mayor contenido de proteína precipitada en medio alcalino. Estos

Obtención, caracterización y propiedades funcionales de fracciones derivadas de la harina de soja desgrasada

resultados resaltan la incidencia del proceso de sonicado y de la etapa del proceso de extracción donde es aplicado, sobre la composición de las fracciones obtenidas.

Tabla 2.1. Rendimiento de extracción y análisis composicional de la harina de soja y de las diferentes fracciones de okara de soja

Muestra	Rendimiento (%)	Proteína (% m/m, bh)	FDT (% m/m, bh)	CDF (% m/m)	Humedad (% m/m)	Cenizas (% m/m)
HDS	-	46,4	17,3	-	8,54	6,2
OK	27,5±1,4 _b	35,3±0,2 _b	47,3±1,2 _b	6,33	6,17±0,3 _a	4,9±0,1 _b
S-OK	54,5±0,8 _c	63,3±0,3 _c	25,3±0,7 _a	2,19	7,21±0,1 _b	2,0±0,1 _a
OK-S	22,5±2.2 _a	23,6±0,2 _a	57,5±0,5 _c	7,44	6,46±0,2 _a	5,0±0,1 _b

Nota. bh: base húmeda. HDS: Harina de soja desgrasada, FDT: Fibra dietaria total, CDF: Carbohidratos diferentes de fibra (determinados por diferencia). Letras diferentes en cada columna son significativamente diferentes ($P < 0,05$). Valores promedio ($n = 3$) \pm desvío estándar.

Como se mencionaba anteriormente, el okara contiene un alto contenido de polisacáridos y proteínas insolubles en condiciones alcalinas, parte de los cuales también son insolubles después de ser sometidos a un tratamiento ácido como se describió en el **ítem 2.2.2.1**. En este sentido, los rendimientos de las fracciones de polisacáridos insolubles de soja fueron: ISPS 16,3%, S-ISPS 35,4% e ISPS-S 15,4%. Lógicamente inferiores a las fracciones de okara correspondientes. La **Tabla 2.2** muestra los resultados de los rendimientos y composición de las fracciones ISPS.

Obtención, caracterización y propiedades funcionales de fracciones derivadas de la harina de soja desgrasada

Tabla 2.2. Rendimiento de extracción y análisis composicional de diversas muestras de polisacáridos insolubles de soja (ISPS)

Muestra	Rendimiento (%)	Proteínas (% m/m, bh)	FDT (% m/m, bh)	CDF (% m/m)	Humedad (%m/m)	Cenizas (%m/m)
ISPS	16,3±1,84 _a	37,66±0,11 _b	45,17±0,3 _c	3,09	7,26±0,15 _a	6,71±0,88 _a
S-ISPS	35,4±1,33 _b	51,45±0,18 _c	31,96±1,2 _a	2,76	7,78±0,22 _b	7,04±0,76 _a
ISPS-S	15,4±2,12 _a	33,45±0,09 _a	44,05±1,1 _b	3,20	9,83±0,11 _c	9,45±0,67 _b

Nota. bh: base húmeda. HDS: Harina de soja desgrasada, FDT: Fibra dietaria total, CDF: Carbohidratos diferentes de fibra (determinados por diferencia). Letras diferentes en cada columna son significativamente diferentes ($P < 0,05$). Valores promedio ($n = 3$) \pm desvío estándar.

Las muestras de ISPS e ISPS-S presentaron un mayor contenido de proteína que sus respectivos okaras, esto se debe a las características de alta insolubilidad que presentan las proteínas que se insolubilizaron durante la extracción alcalina, las mismas mantienen ese comportamiento luego de someterlas a la extracción ácida en condiciones de alta presión de vapor y temperatura (Porfiri et al., 2017). A esta característica, se le adiciona la insolubilización de las estructuras relacionadas con los polisacáridos solubles de soja (SSPS) (Furuta et al., 1998), efecto que ocurrió en las tres muestras estudiadas.

Por otro lado, la muestra que proviene del okara sonificado previa extracción alcalina (S-ISPS) presentó, al igual que en los respectivos okaras, un rendimiento de

extracción mayor al de las otras muestras. Esta muestra fue la única que presentó una reducción en el contenido porcentual de proteínas, que puede relacionarse con la solubilización a pH ácido de parte de las estructuras proteicas que se habían insolubilizado debido al proceso de sonicación previo al tratamiento alcalino (Fuji et al., 2010). En este sentido, la solubilización de estas estructuras a pH ácido y sometidas a altas temperaturas, pudo haber sido consecuencia de la presencia de un efecto disociativo de las estructuras cuaternarias y terciarias de ciertas fracciones proteicas y/o de un proceso de hidrólisis, que disminuyó el peso molecular de las mismas (Zhang et al., 2013; Porfiri et al., 2017).

2.4.2' Electroforesis de okara en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

El SDS-PAGE se realizó en condiciones no reductoras y reductoras β -ME agregado al buffer de muestra (**Figura 2.3**). Todas las muestras de okara presentaron bandas similares. Particularmente, las muestras OK y OK-S mostraron perfiles electroforéticos similares en ambas condiciones. Las diferencias más resaltables se observaron en las bandas S-OK que mostraron una mayor concentración en las subunidades relacionadas con la fracción 11S, denominada glicinina. En este sentido, en condiciones no reductoras, la muestra S-OK presentó una banda bien definida con un peso molecular atribuible a la subunidad 11S AB. Esta subunidad, al ser sometida a condiciones reductoras, se disociaría en las subunidades A y B, las cuales son claramente

Obtención, caracterización y propiedades funcionales de fracciones derivadas de la harina de soja desgrasada

observables en el respectivo gel de electroforesis. Este análisis electroforético permitió inferir que el mayor contenido de proteína del S-OK se debería a un aumento significativo de la tendencia a precipitar de las fracciones 11S luego de ser sometidas a un proceso de sonicación previo a la extracción alcalina (Moscoso Ospina et al., 2022).

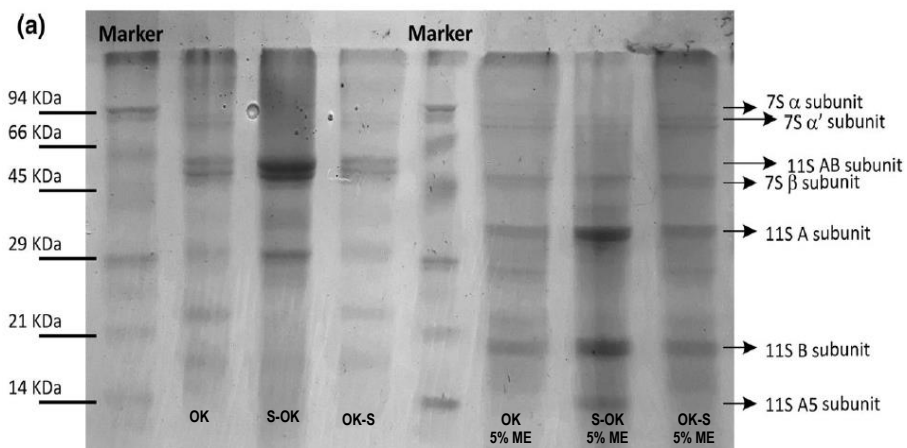


Figura 2.3. Composición proteica de muestras de okara de soja (OK, S-OK y OK-S) analizadas en condiciones no reductoras y reductoras (5% de β -ME) mediante dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida electroforesis en gel (SDS-PAGE). Marcadores de peso molecular (PM): α -lactoalbúmina, 14,4kDa; inhibidor de tripsina, 20,1kDa; anhidrasa carbónica, 30,0kDa; ovoalbúmina, 43,0kDa; albúmina de suero bovino, 67,0kDa y fosforilasa b, 94,0kDa.

Por otro lado, todas las muestras exhibieron agregados proteicos de alto PM que permanecieron en el punto de siembra. En esta zona superior del gel apilador se muestran bandas de PM superiores a 100KDa que permanecieron aún en condiciones reductoras. Estas estructuras podrían estar relacionadas a la presencia de proteínas de elevado peso

molecular y/o a estructuras proteicas asociadas covalentemente a polisacáridos, conformando una glicoproteína.

2.4.2.1 Electroforesis de ISPS en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Los geles de acrilamida en condiciones reductoras y no reductoras para las fracciones de ISPS se realizaron con procedimiento descrito en el **ítem 2.3.4**. Cabe resaltar, que no hay registro bibliográfico que evidencie un análisis sobre este tipo de fracciones con un elevado contenido de polisacáridos de alto peso molecular. La **Figura 2.4** permite observar un frente de corrida del gel con agregados de alto peso molecular superiores a 100KDa, sin bandas definidas de estructuras proteicas entre 14 y 94KDa. Esto puede atribuirse a que el SDS y β -ME no lograron disociar las uniones de los péptidos de alto peso molecular presentes en este tipo de muestras. Adicionalmente, observamos bandas de péptidos de bajo peso molecular en todas las muestras de ISPS analizadas. Dichos péptidos podrían generarse a causa del fuerte tratamiento de temperatura y presión, en tiempos prolongados, al que se somete el okara húmedo durante la extracción de los polisacáridos insolubles de soja (ISPS).

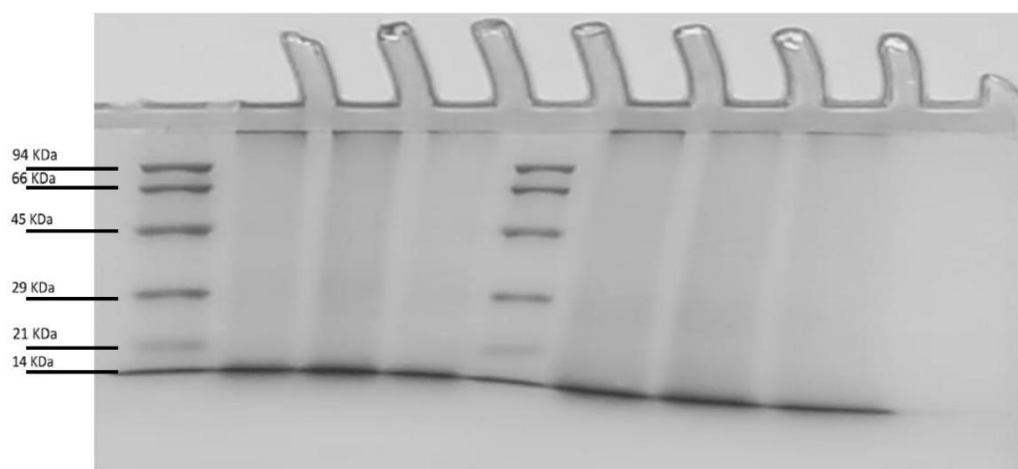


Figura 2.4. Composición proteica de muestras de polisacáridos insolubles de soja (ISPS, S-ISPS y ISPS-S) analizadas en condiciones no reductoras y reductoras (5% de β -ME) mediante dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida electroforesis en gel (SDS-PAGE). Marcadores de peso molecular (PM): α -lactoalbúmina, 14,4kDa; inhibidor de tripsina, 20,1kDa; anhidrasa carbónica, 30,0kDa; ovoalbúmina, 43,0 kDa; albúmina de suero bovino, 67,0kDa y fosforilasa b, 94,0kDa.

Estos resultados plantearon la necesidad de analizar otras metodologías de degradación de proteínas con una solución de agentes desnaturizantes más compleja (urea 6.0M, SDS 0.5% m/m, 30mM DTT). Para ello, se procedió a realizar un análisis donde se analizó el efecto de estos agentes sobre la turbidez de dispersiones diluidas de las diferentes muestras de ISPS. Este estudio no evidenció cambios significativos en los valores de turbidez de dichas muestras (resultados no mostrados), permitiendo inferir que

este nuevo agente desnaturizante no permitirá un cambio significativo sobre las estructuras proteicas que permita la detección de bandas en los geles SDS-PAGE. Se puede concluir que las proteínas presentes en los polisacáridos insolubles de soja estarían unidas covalentemente a estructuras de polisacáridos, conformando, como se mencionó previamente, una glicoproteína y/o podrían presentarse en forma de agregados de elevado peso molecular generados luego de un proceso drástico a elevada temperatura, acidez y presión, como el tratamiento de autoclave.

2.4.3' Análisis de azúcares neutros

Se analizó el contenido en porcentaje molar de los monosacáridos neutros (ramnosa, fucosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa) para las diferentes fracciones de okara e ISPS. La fracción de carbohidratos insolubles de la soja, provienen de las estructuras de la pared celular del grano de soja, y se compone mayoritariamente por polisacáridos no celulósicos y minoritarios celulósicos (10%). Entre los no celulósicos se destacan los polisacáridos ácidos, compuestos por un núcleo básico de ácido D-galacturónico, L-ramnosa y ramificaciones constituidas por residuos de galactosa y arabinosa (Huisman et al., 1998). En relación con dichas estructuras, los monosacáridos predominantes en fracciones de okara fueron galactosa, glucosa y arabinosa. Estos resultados se muestran en la **Tabla 2.3**

Obtención, caracterización y propiedades funcionales de fracciones derivadas de la
harina de soja desgrasada

Tabla 2.3. Contenido de azúcares componentes neutros

Azúcar (%)	Muestra					
	OK	S-OK	OK-S	ISPS	S-ISPS	ISPS-S
Rammosa	4,4±0,2 _e	2,8±0,2 _d	2,0±0,7 _c	1,9±0,1 _b	1,5±0,1 _a	1,8±0,1 _{b,c}
Fucosa	2,7±0,2 _d	1,1±0,1 _b	0,9±0,1 _a	1,6±0,2 _c	1,2±0,1 _b	1,6±0,1 _c
Arabinosa	18,9±1,5 _d	14,6±1,4 _c	14,4±0,9 _c	6,2±1,0 _a	6,2±1,5 _a	8,0±0,1 _b
Xilosa	5,8±0,7 _b	1,8±0,4 _a	1,9±0,3 _a	15,0±1,6 _d	14,1±0,8 _{cd}	13,6±0,4 _c
Manosa	2,3±0,1 _a	3,4±0,5 _a	2,1±0,1 _a	5,3±1,1 _{cd}	4,9±0,4 _c	5,6±0,2 _d
Galactosa	36,3±1,5 _b	40,7±0,9 _c	40,2±1,0 _c	20,3±1,1 _a	19,9±2,2 _a	19,8±1,9 _a
Glucosa	29,6±1,2 _a	35,6±1,6 _b	38,5±1,3 _c	49,8±3,5 _d	52,1±4,2 _d	49,6±2,3 _d

Nota. Proporción de azúcares componentes neutros, expresados en % molar para las fracciones de okara e ISPS analizados por cromatografía gaseosa de alditoles paracetilados generados por hidrólisis ácida. Letras diferentes en cada fila son significativamente diferentes ($P < 0,05$). Valores promedio ($n = 3$) \pm desvío estándar.

Como se mencionaba antes, la celulosa y la hemicelulosa son polisacáridos presentes en la pared celular (Huisman et al., 2000; Rupérez et al., 1985). Las muestras de S-OK y OK-S registraron una composición sin diferencias destacables entre sí, sin embargo, presentaron una concentración de glucosa y galactosa superior a la muestra que no fue sometida a un tratamiento de sonicación. En este sentido, es probable que la sonicación aumente la tendencia a precipitar de algunos restos celulósicos. Esto resalta la incidencia del ultrasonido en las características relacionadas a la composición de las diferentes fracciones de okara.

Obtención, caracterización y propiedades funcionales de fracciones derivadas de la harina de soja desgrasada

La fracción soluble extraída a partir de la harina de soja, luego de realizar un tratamiento alcalino seguido de un tratamiento ácido, como el propuesto en este trabajo de investigación, se denomina comercialmente polisacárido soluble de la soja (SSPS). Este polisacárido está compuesto por un esqueleto principal de ramnogalacturonano ramificado por cadenas de β -1,4-galactano y α -1,3- o α -1,5-arabinano, y homogalacturonano, y contiene una fracción proteica minoritaria (Nakamura et al., 2003). Esto permite explicar la reducción de los contenidos de galactosa y arabinosa observados en las fracciones de ISPS, luego de la separación de las fracciones solubles realizadas sobre las muestras de okaras. En este sentido, las fracciones de ISPS están compuestas principalmente por glucosa (>49%) y galactosa (>19%), estos resultados son similares a los reportados por Porfiri et al. (2017). Como se mencionó anteriormente, el elevado contenido de glucosa puede relacionarse con la presencia de residuos de material celulósico en la harina de soja de partida. Dentro de estas estructuras, derivadas de las paredes celulares, también pueden mencionarse los arabinogalactanos, los glucomananos y los xiloglucanos (O'Toole, 2004; Redondo-Cuenca et al., 2008; Huisman et al., 2000). Por último, también se observó una similitud en la composición monosacárida de las tres fracciones de polisacáridos insolubles de soja. La insolubilidad de las muestras en condiciones alcalinas y ácidas podría inferir la presencia de carbohidratos unidos covalentemente a proteínas en una matriz glicoproteica, por ejemplo, formando proteínas arabinogalactanos (AGPs) y/o proteínas glucomananos (Aspinall y Whyte, 1964; Fincher, Stone y Clarke, 1983). Esta matriz, como se observa en diferentes gomas y pectinas,

puede conducir a compuestos tensioactivos potencialmente aplicables en la formulación de emulsiones (Dickinson, 2009).

2.4.4' Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)

Las bandas espectrales de FTIR mostraron que la composición de okara se modificó sustancialmente debido a los diferentes procesos de sonicación (**Figura 2.5 y 2.6**). Estos espectros FTIR mostraron bandas correspondientes a la región de carbohidratos ($900\text{--}1200\text{cm}^{-1}$) y las bandas características de la región de proteínas (amida I: $\sim 1636\text{cm}^{-1}$ y amida II: $\sim 1537\text{cm}^{-1}$). En este sentido, la proporción de las mencionadas bandas se encuentra en línea con la relación proteína/TDF enumerada en la **Tabla 2.1**. Por otro lado, la relación entre las intensidades de las bandas de amida I y II de la muestra S-OK (Amida I/II: 0,97) fue mayor a la presente en las muestras OK (Amida I/II: 0,85) y OK-S (Amida I/II: 0,71). En este sentido, Dev et al. (1988) analizaron específicamente las estructuras de la globulina 11S en diferentes soluciones acuosas mostrando una proporción de intensidades de amida I/II cercanas a 1. Por ello, este resultado puede relacionarse con los datos analizados anteriormente en relación a la presencia de un elevado contenido de fracciones de globulina 11S en las muestras de S-OK.

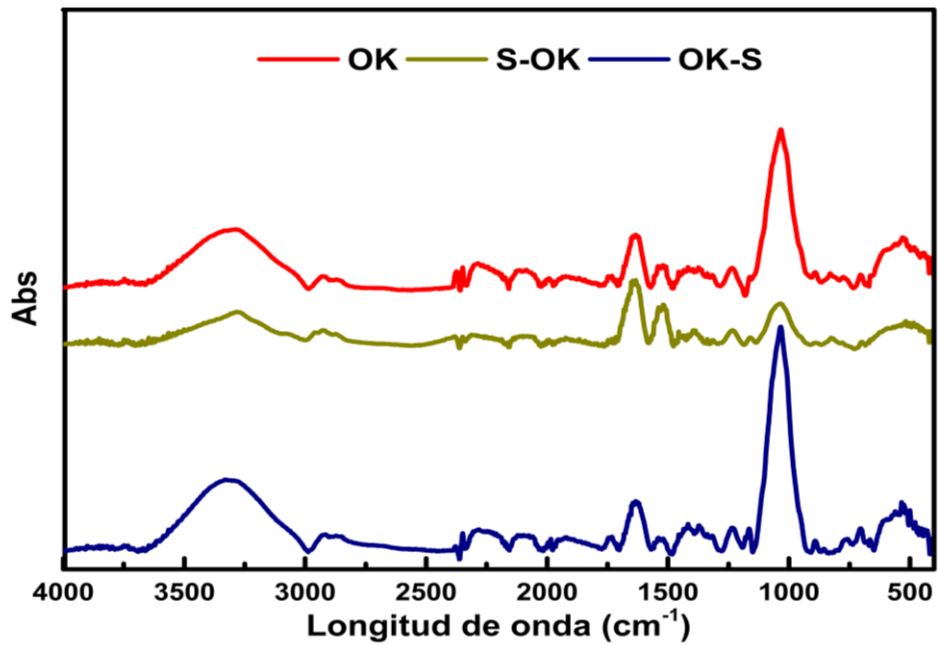


Figura 2.5. Espectros de FTIR de diferentes fracciones de okara de soja.

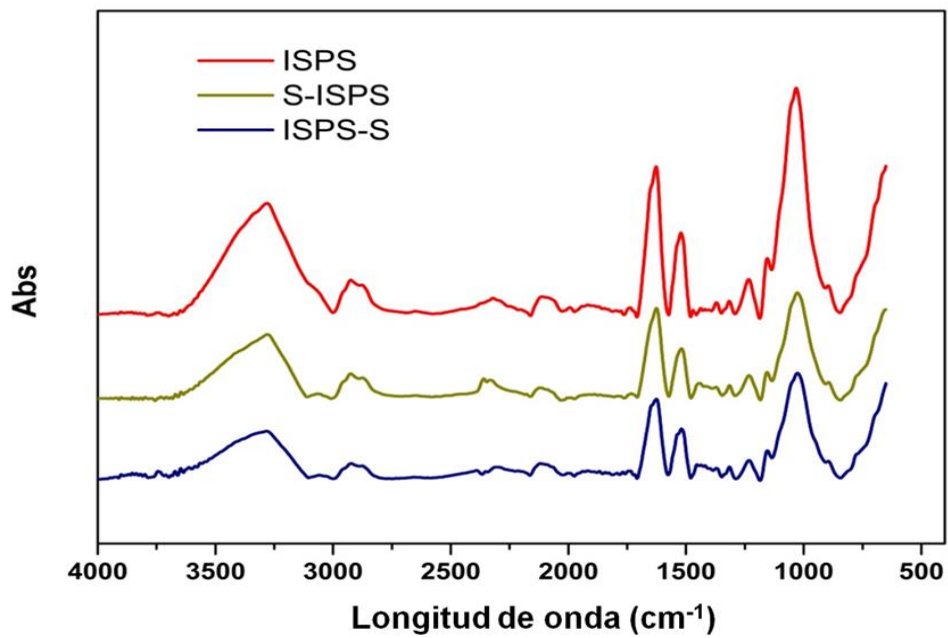


Figura 2.6. Espectros de FTIR de diferentes fracciones de polisacáridos insolubles de soja.

Las características estructurales de los polisacáridos insolubles de soja se muestran en la **Figura 2.6**. Las muestras presentan un perfil espectral característico para las estructuras de polisacáridos de alto peso molecular, con un amplio pico alrededor de $3000-3700\text{cm}^{-1}$ y un pico de menor tamaño es observado a 2930cm^{-1} correspondientes al estiramiento o “stretching” de grupos OH de los enlaces de hidrógeno y al estiramiento del grupo CH, respectivamente (Coimbra et al., 1998; Mateos-Aparicio et al., 2010). Adicionalmente, los picos que se encuentran en un rango entre $1000-1400\text{cm}^{-1}$ (**Figura 2.6**), corresponden en gran medida a las vibraciones de estiramiento o “stretching vibrations” de las cadenas laterales OH del enlace glucosídico (C-O-C) (Coimbra et al., 1998).

Además de los picos relacionados a las estructuras de los polisacáridos, se pueden observar las bandas correspondientes a las amidas I y II, aproximadamente a una longitud de onda de $1700-1600$ y 1550cm^{-1} , respectivamente (**Figura 2.6**), lo que confirma la presencia de las estructuras proteicas descritas en los análisis composicionales (**Tabla 2.2**). Cabe señalar que las relaciones Amida I/II fueron cercanas a 1 y similares entre las fracciones, con valores de 0,9353 para ISPS, 0,9352 para S-ISPS y 0,9343 para ISPS-S, lo que indica que las características estructurales de las proteínas sometidas a ambos procesos de extracción (alcalina y ácida), podrían no haberse visto afectadas por el proceso de sonicación como ocurrió con los respectivos okaras.

2.4.5 Morfología

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido de bajo vacío de las diferentes fracciones de okara se muestran en la **Figura 2.7**. La fracción OK presentó fibras compactas de gran tamaño ($>30\mu\text{m}$), morfológicamente diferente con respecto a las fracciones de S-OK y OK-S.

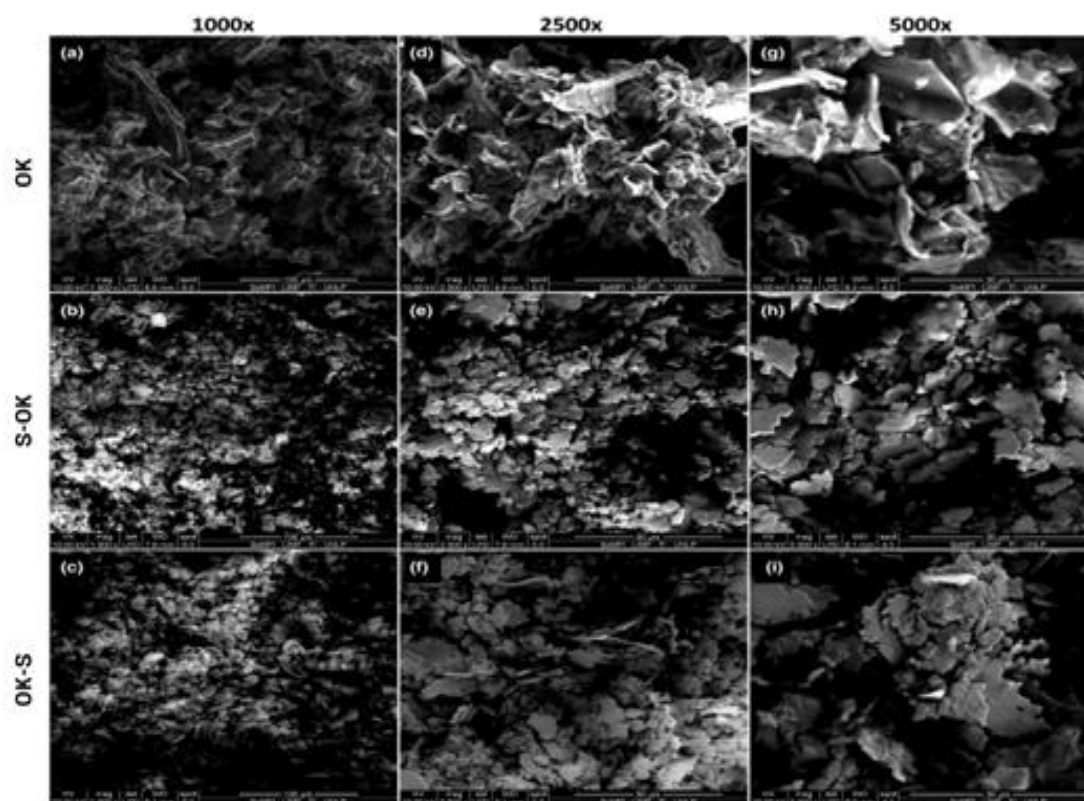


Figura 2.7. Microscopía electrónica de barrido de las diferentes fracciones de okara de soja, con aumentos de 1000X, 2500X y 5000X.

En este sentido, las fracciones sometidas al efecto del ultrasonido, exhibieron un rompimiento y/o desplegamiento de las estructuras de los polisacáridos de alto peso molecular, obteniendo unidades de menor tamaño, estas fibras se redujeron considerablemente y por lo tanto aumentaron su área superficial. La reducción del tamaño de partícula de estas estructuras, ya sea por sonicación o por tratamientos de altas presiones, pueden influir positivamente sobre las propiedades funcionales, como la propiedad emulsificante de dichas fracciones (Colletti et al., 2020). Estos tratamientos de alta energía pueden también incidir en forma directa sobre las estructuras proteicas presentes en las respectivas fracciones, modificando sus propiedades estructurales y funcionales (Fang et al., 2021). Lyu et al. (2021) realizaron microscopías con aumentos similares en fibras de okara. En esta investigación trataron las fibras de okara enzimáticamente con α -amilasas, las cuales también disminuyeron su tamaño de partícula.

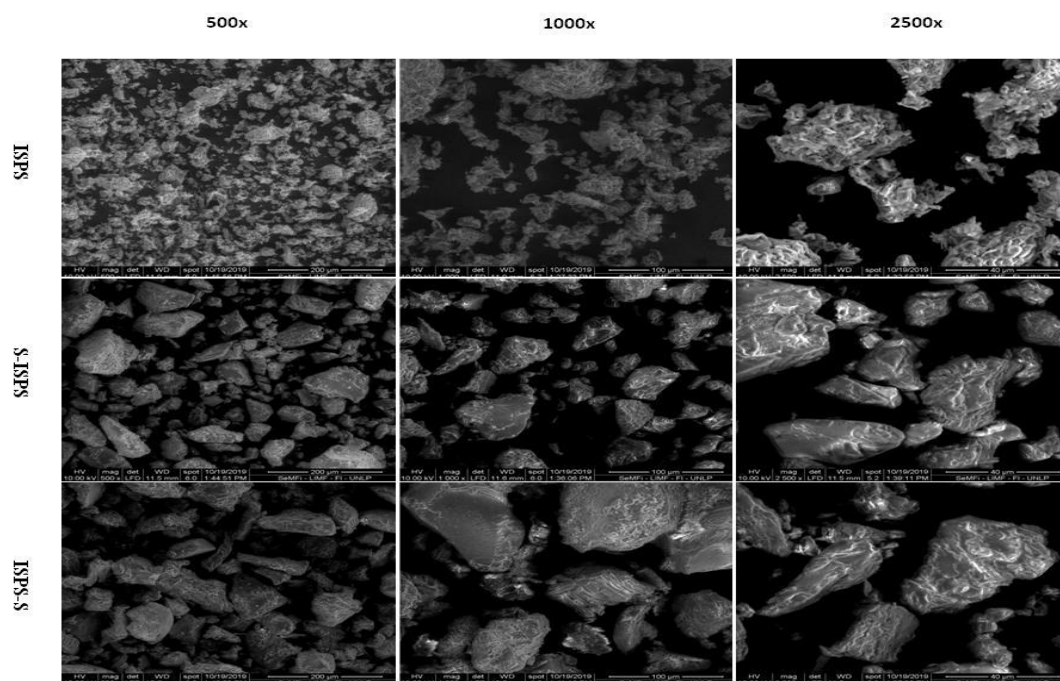


Figura 2.8. Microscopía electrónica de barrido de las diferentes fracciones de polisacáridos insolubles de soja, con aumentos de 500X, 1000X y 2500X.

Las micrografías de las tres muestras de polisacáridos insolubles de soja se muestran en la **Figura 2.8**. Dichas muestras están compuestas por partículas pequeñas totalmente amorfas y densas, con gránulos no circulares, arrugados y dañados. Puede notarse claramente que las muestras sometidas a sonicación (S-ISPS e ISPS-S) presentaron estructuras con un mayor tamaño respecto a la fracción sin tratamiento. Las fracciones de ISPS presentan estructuras más pequeñas con respecto a sus otras dos variantes, con un tamaño aproximado a $40\mu\text{m}$ a un aumento de 2500X. Estas diferencias

podrían relacionarse a la presencia de agregados compactos de gran tamaño en las muestras sonicadas.

2.5 Conclusiones parciales

- ✓ El proceso de sonicación puede generar un mayor o menor porcentaje de rendimiento, dependiendo de la etapa de extracción en la que sea aplicado. Este proceso modifica la solubilidad de algunos componentes. En el caso del proceso de sonicación previo al tratamiento alcalino, la cavitación provocaría el desplegamiento de las estructuras proteicas con una consecuente exposición de los residuos hidrofóbicos, teniendo como consecuencia la formación de agregados y el aumento de la tendencia a precipitar de dichas estructuras.
- ✓ Las fracciones de okara analizadas mediante electroforesis, en condiciones reductoras y no reductoras, presentan perfiles electroforéticos similares. Las bandas correspondientes a la fracción S-OK mostró un elevado contenido de glicina 11S, probablemente debido al aumento de la tendencia a precipitar de dichas fracciones proteicas debido al proceso de sonicación previa extracción alcalina. Por otro lado, no pudo realizarse un análisis similar sobre el contenido proteico de las fracciones de ISPS, este se encontraría unido covalentemente a las

- estructuras de los polisacáridos y/o formando complejos de elevado peso molecular, dificultando su identificación mediante esta técnica de análisis.
- ✓ Los monosacáridos presentes en las diferentes fracciones de okara y polisacáridos insolubles de soja fueron manosa, fucosa, arabinosa, xilosa, galactosa y glucosa. En todas las fracciones de okara, los monosacáridos mayoritarios fueron la galactosa y la glucosa, provenientes principalmente del material celulósico y de diferentes estructuras relacionadas a galactanos y homogalacturonanos. Por otro lado, las fracciones de ISPS presentan un alto contenido de glucosa, galactosa y xilosa. El elevado contenido de glucosa en las tres fracciones, evidencia un elevado contenido de material de naturaleza celulósica. Por último, la insolubilidad de estas fracciones en condiciones alcalinas y ácidas puede asociarse a la presencia de polisacáridos unidos covalentemente a estructuras proteicas, en una matriz glicoproteica, formando posiblemente estructuras como las observadas en los arabinogalactano y/o proteínas de glucomanano.
 - ✓ El efecto de sonicado generó cambios importantes en los espectros generados por FTIR principalmente en la región relacionada con las proteínas (Amida I~1636cm⁻¹ y II~1537cm⁻¹). La presencia de globulinas 11S en soluciones acuosas fueron reportadas por otros autores mostrando relaciones de intensidad de amida I y II cercanas a 1. En este sentido, el aumento de la señal en la región amida II en

- la fracción S-OK dio como resultado una relación de 0.97. Por otro lado, las fracciones ISPS presentaron un perfil espectral característico de las estructuras de polisacáridos de alto peso molecular. Las relaciones Amida I/II fueron cercanas a 1 y similares entre fracciones, esto indicaría que las características estructurales de las proteínas sometidas a ambos procesos de extracción (alcalina y ácida), podrían no verse afectadas por el proceso de sonicación como ocurrió durante la obtención de las respectivas fracciones de okara.
- ✓ La cavitación ejerce una ruptura de las estructuras de los polisacáridos disminuyendo considerablemente el tamaño de partícula de las fracciones de los okara y aumentando su área superficial. Por otro lado, la alta presión a la que se somete el sistema también pudo generar la formación de agregados proteicos de elevado peso molecular.

Capítulo 3

Propiedades de interfase

3.1 Introducción

La caracterización interfacial de los sistemas alimentarios es fundamental para el investigador o desarrollador de alimentos. Muchos productos alimenticios (aderezos para ensaladas, coberturas batidas y helados) son sistemas de coloides dispersos, como emulsiones, suspensiones o espumas. La textura, estructura y estabilidad de estas dispersiones tienen una importancia fundamental para el fabricante de alimentos. El área interfacial de las dispersiones finas es muy alta y, por lo tanto, estas interfaces influyen fuertemente en el comportamiento de las dispersiones. La textura y estructura de los alimentos es muy delicada, por lo que en sus investigaciones se deben aplicar métodos experimentales que causen poco o ningún daño estructural.

3.1.1 Coloide

Un coloide es una combinación estable de partículas de una sustancia que se suspenden en una segunda sustancia; dichas partículas tienen al menos una de las dimensiones principales de aproximadamente 1 nm a 1 μ m. El pequeño tamaño de las partículas coloidales significa que un alto porcentaje de las moléculas estarán en la superficie. La química de la superficie es de vital importancia para la comprensión de sus propiedades. Una emulsión es un sol en el que las partículas suspendidas son gotas líquidas y la fase continua también es líquida; las dos fases son inmiscibles, de lo

contrario se formaría una solución. Una suspensión coloidal es un sol de partículas sólidas suspendidas en un líquido. La espuma es un sistema coloidal de burbujas de gas dispersas en un líquido o sólido (Bajpai, 2018). De acuerdo con las diferentes propiedades de las partículas, el sistema coloidal se puede agrupar en dos clasificaciones generales:

1. Sol: hay energías de interfase y sin interfase entre la fase dispersa y el medio de dispersión. Es un sistema termodinámicamente inestable e irreversible y no se reconstituye fácilmente después de la separación de fases. Esto a menudo se llama un coloide lióforo.
2. La solución del material macromolecular: no hay interfase y energías libres de interfase entre la fase dispersa y el medio de dispersión. Es un sistema termodinámicamente estable y puede recuperarse después de la separación. Esto a menudo se llama un coloide liófilo.

Hay algunas propiedades similares y algunas propiedades diferentes entre los dos tipos de sistemas coloidales. Las propiedades relacionadas con el tamaño de partícula son similares, pero las propiedades relacionadas con la interfase son diferentes. Por ejemplo, las propiedades dinámicas, las propiedades ópticas, las propiedades reológicas, etc., son similares, pero las propiedades eléctricas, las propiedades de adsorción, etc., son diferentes. Aunque el tamaño de las partículas en el sistema de suspensión es mayor que

en el sistema coloidal, también hay una mayor interfase entre la fase dispersa y el medio de dispersión en el sistema de suspensión, y muchas propiedades del sistema de suspensión son similares a las del sistema coloidal; por lo tanto, el estudio sobre el sistema de suspensión generalmente se incluye en la categoría de química coloidal (Chang, 2016).

3.1.2 Solubilidad proteica

La solubilidad proteica es la capacidad de un material proteico para formar soluciones coloidales. El concepto de solubilidad depende de las condiciones experimentales para su determinación y, por ende, es un concepto operativo, dado que no se puede hacer una definición termodinámica. En este contexto, la solubilidad proteica se define como la proporción de nitrógeno (o proteína) de una muestra que se solubiliza luego de un procedimiento específico de solubilización (Pilosof, 2000). En general, este procedimiento incluye un proceso de agitación suave (por ejemplo, agitación magnética) a una temperatura y tiempo definidos. Luego, las partículas insolubles se remueven por centrifugación en condiciones definidas, o por filtración, y se procede a la determinación de proteínas en el sobrenadante o líquido filtrado. La solubilidad proteica depende del estado físico-químico de sus moléculas, el pH, la temperatura, la fuerza iónica y la presencia de ciertos solventes orgánicos.

3.1.3' Tensiones superficiales e interfaciales

La atracción entre las moléculas de un líquido en la superficie está sujeta a una fuerza neta dirigida hacia dentro del cuerpo líquido. Esto da como resultado la formación de una estructura similar a una película, o membrana, con cierta resistencia al cambio. La superficie del líquido tenderá a ajustarse de tal manera que se minimice su área superficial.

Por otro lado, para crear una nueva superficie se deberá otorgar energía al sistema. La energía necesaria para aumentar la superficie por unidad de área se denomina "tensión superficial", cuando analicemos una interfase entre un líquido y un gas. Por otro lado, para referirse a la tensión de una interfase generada entre dos líquidos, se utiliza el término "tensión interfacial". Las unidades del SI para tensión interfacial son mili-Newtons por metro ($N \times 10^{-3}/m$), que es exactamente igual a la obsoleta unidad, dinas por centímetro (Tiab & Donaldson., 2004).

3.1.4' Reología interfacial

La reología es el estudio de la relación entre la fuerza (esfuerzo) y la deformación de los materiales. Se pueden destacar dos comportamientos reológicos simples, que son fluidos viscosos y sólidos elásticos. Un fluido en reposo no puede resistir fuerzas cortantes, por lo que bajo la acción de tales fuerzas se deforma continuamente. Con la eliminación de la fuerza, se deja de deformar, pero permanece cualquier deformación anterior. Si esta fuerza se aplica a un sólido elástico, se deformará instantáneamente, pero

la forma inicial se recupera por completo al eliminar la fuerza. Esto sucede porque para los sólidos, la resistencia a una deformación por cortante depende de la deformación misma; es decir, el esfuerzo cortante es una función de la deformación unitaria. Ya para fluidos, el esfuerzo cortante es una función de la velocidad de deformación. Sin embargo, existen materiales que tienen un comportamiento intermedio entre estos dos, conocidos como materiales viscoelásticos, debido a que tienen características tanto viscosas como elásticas (Coffler, 2022).

La reología interfacial estudia las interfaces que se forman cuando dos líquidos inmiscibles se ponen en contacto. El conocimiento sobre la respuesta mecánica de estas interfaces es extremadamente importante. El estudio de estas características complejas de la interfase se asocia con el término reología bidimensional o 2D, mientras que las propiedades de amontonamiento se conocen como reología 3D (Derkach et al., 2009). La tensión interfacial se reduce mediante la adsorción de tensioactivos en la interfaz agua/aceite y se facilita la formación de emulsiones. Las estructuras interfaciales afectan la formación y estabilidad de las emulsiones. La fuerza de la película formada retrasa o inhibe el proceso de coalescencia. Las propiedades interfaciales, directamente relacionadas con las características de las capas adsorbidas, son muy importantes en la dinámica de la coalescencia (Santini et al., 2007; Pandolfini et al., 2017). La reología dilatacional interfacial, que representa la respuesta del estrés interfacial a las deformaciones dilatacionales de la interfaz, permite la caracterización de las propiedades

viscoelásticas de la capa adsorbida (Lucassen-Reynders, 1993; Jaensson y Vermant, 2018).

La región interfacial es capaz de responder a las perturbaciones como deformaciones de expansión/compresión (cambios de área o volumen en forma constante) o cizallamiento (cambios de forma en área o volumen constante).

3.1.5' Potencial- ζ

El potencial ζ , es una medida del potencial eléctrico en la superficie interfacial de las partículas suspendidas. Sus unidades son los milivoltios (mV). Los valores de -30 a 30 mV indican inestabilidad en el sistema, valores por debajo de -30 y arriba de 30mV, indican aumento en la estabilidad, siendo ésta, cada vez mayor conforme aumenta (de forma absoluta) el valor del potencial ζ . La medición se realiza en una celda electroquímica con dos electrodos conectados a una fuente de poder, esto crea un campo eléctrico. Los coloides migran, y dependiendo de su movimiento y dirección se tiene el valor del potencial ζ (Kosegarten y Jiménez, 2012).

El valor del potencial ζ se ve marcadamente afectado por el pH de la emulsión, por el efecto de éste en la carga de las partículas. Así, las variaciones en el pH resultarán en variaciones en el potencial ζ y, por tanto, en la estabilidad de la emulsión. En una dispersión proteica, por ejemplo, un potencial ζ de cero a cierto pH, coincide con el punto isoeléctrico, y provocará precipitación de estas macromoléculas (Maldonado et al., 2011).

La existencia de iones en la fase acuosa de la emulsión, tiene también un efecto directo en el valor del potencial ζ y, por ende, en la estabilidad de la emulsión. El tamaño de gota, independientemente del tipo y concentración de emulsificantes, temperatura y características de la homogeneización, tienen efecto sobre su tamaño, y es influenciado por los valores del pH y concentración electrolítica (Kosegarten y Jiménez, 2012).

3.2 Materiales y métodos

3.2.2 Solubilidad proteica

El contenido de proteínas se determinó usando el método espectrofotométrico de Lowry modificado usando BSA como proteína estándar (Markwell et al., 1981). Para esta determinación se tuvo en cuenta el valor de proteína total por método de Kjeldahl. Las muestras de okara (OK, S-OK, OK-S) e ISPS (ISPS, S-ISPS, ISPS-S) se dispersaron en agua destilada (0,1% m/V) por agitación magnética suave durante 2h, se le ajustó el pH a cada muestra entre 2,0 y 8,0, usando soluciones de HCl 0,1M o NaOH 0,1M. Luego estas dispersiones fueron centrifugadas a 10.000xg durante 20 minutos a 20°C (centrífuga Hermle 129 Z200 M/H; Wehningen, Alemania) y se descartó el sedimento. El contenido de proteína se determinó en los sobrenadantes.

Para la determinación de la concentración de proteína en las dispersiones, se preparó una solución madre patrón de concentración de BSA 0,1% m /V (1000 μ g/ml) en

agua destilada y a partir de la misma, diluciones en un rango de concentración de proteína entre 20 y 100µg/ml. Como blanco se utilizó agua destilada.

Para la realización colorimétrica se prepararon los siguientes reactivos: reactivo A: se disolvieron 4,0g de NaOH, 20,0g de Na₂CO₃, 10,0g de SDS y 1,6g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado (Sal de Rochelle) en agua destilada hasta un volumen final de 1 litro; reactivo B: se disolvieron 4,0g de CuSO₄·5H₂O en agua destilada hasta completar un volumen final de 100ml; reactivo C: reactivo alcalino de cobre, obtenido mezclando los reactivos A y B en una proporción volumétrica 100:1V/V; reactivo D: reactivo comercial de Folin-Ciocalteu.

Para la reacción colorimétrica a 1,0ml de agua destilada (blanco) o dispersión acuosa (muestra, patrón), se le agregaron 3,0ml de reactivo C incubando durante 60min a temperatura ambiente. Luego, se agregó 0,3ml de reactivo D, se agitó vigorosamente en un vortex y se incubó durante 45min. Finalmente, se midió la absorbancia a 660nm (Abs660) en un espectrofotómetro UV-visible T-60 (PG Instruments; Leicestershire, Reino Unido).

Como se mencionó anteriormente, el proceso de calibrado se realizó con distintas diluciones de la solución madre patrón de BSA. El rango seleccionado de concentración proteica ([P]) (20-100µg/ml) aseguró una respuesta lineal de la Abs660 corregida por el blanco (Abs660c) con [P], de acuerdo con el trabajo original (Markwell et al, 1981). La ecuación de la recta de mejor ajuste a los datos experimentales ($Abs660c = B \cdot [P] + A$) se obtuvo por análisis de regresión lineal mediante el método de los mínimos cuadrados

usando el software Origin 9,0 (OriginLab Corporation; Northampton, Massachusetts, USA). La **Figura 3.1** describe, a modo de ejemplo, una de las rectas utilizadas a lo largo del trabajo experimental.

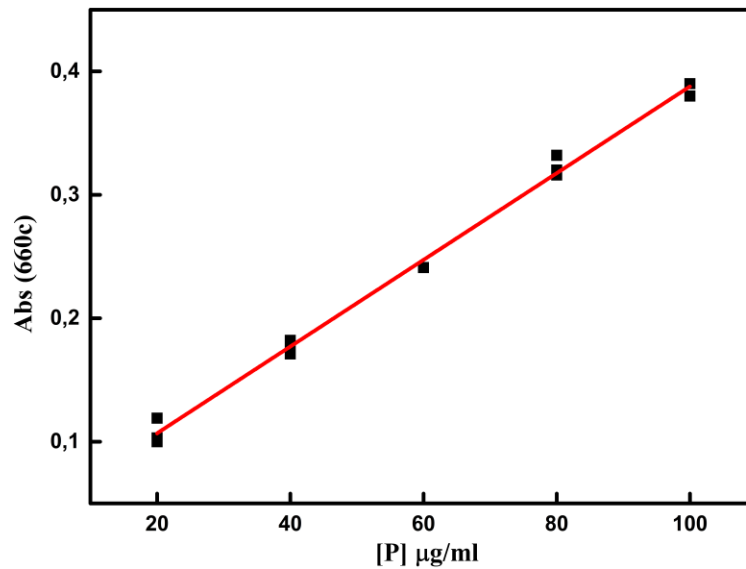


Figura 3.1. Recta de calibración para la determinación de proteína por el método de Markwell et al (1978), obtenida con disoluciones de BSA en un rango de concentración 20–100µg/mL. La ecuación de la recta es: $Abs_{660c} = 0,0035 \cdot [P] - 0,00365$ ($r^2 = 0,99$).

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

$$[P] \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = \frac{Abs_{660c} - A}{B} \quad (\text{Ec 3.1})$$

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

$$[\mathbf{P}] \left(\% \frac{\mathbf{m}}{\mathbf{V}} \right) = [\mathbf{P}] \times \mathbf{f}_d \times \mathbf{f}_c \times \mathbf{100} \text{(Ec 3.2)}$$

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

Finalmente, la solubilidad de proteínas (SP) se calculó como:

$$\mathbf{S}_p = \frac{\mathbf{P}_s}{\mathbf{P}_t} \times \mathbf{100} \text{(Ec 3.3)}$$

Donde P_s es la concentración de proteínas en los sobrenadantes (% m/V), respectivamente; P_t son las concentraciones de proteínas totales (% m/V), respectivamente.

3.2.3' Potencial zeta- ζ

Las diferentes fracciones de okara y ISPS (1% m/m) se dispersaron en buffer citrato de sodio 10mM por agitación magnética durante un periodo de 16h, para asegurar su completa hidratación. Para cada muestra, se ajustó el pH a 3,0 y 4,5. Luego de esto se diluyeron 1:1m/m en buffer citrato de sodio 10mM (**ítem 3.2.2**) a su correspondiente pH, usando soluciones de HCl o NaOH 0,1M. Estas diluciones fueron cargadas en celdas capilares (modelo DTS1070) provistas de electrodos de platino a cada lado (**Figura3.2**) y el potencial- ζ se midió a 25°C usando un analizador Malvern Zetasizer ZSP ZEN 5600

(Malvern Panalytical Ltd; Worcestershire, Reino Unido), a un ángulo fijo de 173° . Las determinaciones se realizaron en tres dispersiones preparadas en forma independiente y con 20 lecturas por réplica.

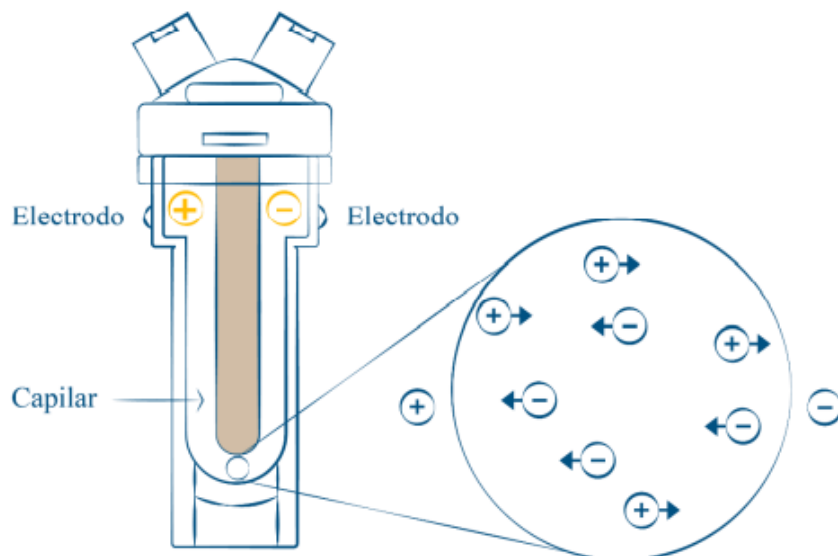


Figura 3.2. Representación de una celda capilar para la determinación de potencial- ζ (Henao, 2021).

3.2.4' Reología interfacial

Las propiedades reológicas en la interfase aceite/agua se evaluaron en dispersiones acuosas de okara (4,0% m/m) y ISPS (2,0% m/m) (Porfiri et al., 2017; Vaccaro, 2016; Moscoso Ospina et al., 2022). Las diferentes muestras, a pH 3,0 y 4,5, se hidrataron en buffer citrato de sodio 10mM (**ítem 3.2.2**) durante un periodo de 16h. Para la determinación, se empleó un reómetro oscilatorio AR-G2 (TA Instruments, Waters

LLC; Newcastle, DE, EE. UU.), al cual se asoció un anillo de Du Noüy (**Figura 3.3**). Para realizar los ensayos, las dispersiones acuosas (20ml) se colocaron en un cristizador de vidrio de 6,7cm de diámetro, se sumergió el anillo y posteriormente se colocó 20ml de aceite refinado de girasol. Finalmente, el anillo se posicionó en la interfase agua/aceite, fijando un gap de 6000 μm (Altura de interfase) en todas las mediciones para asegurar la reproducibilidad. Los barridos de tiempo se realizaron con una frecuencia constante de 0,1Hz y una deformación ajustada al 3,0% dentro del rango de viscoelasticidad lineal.

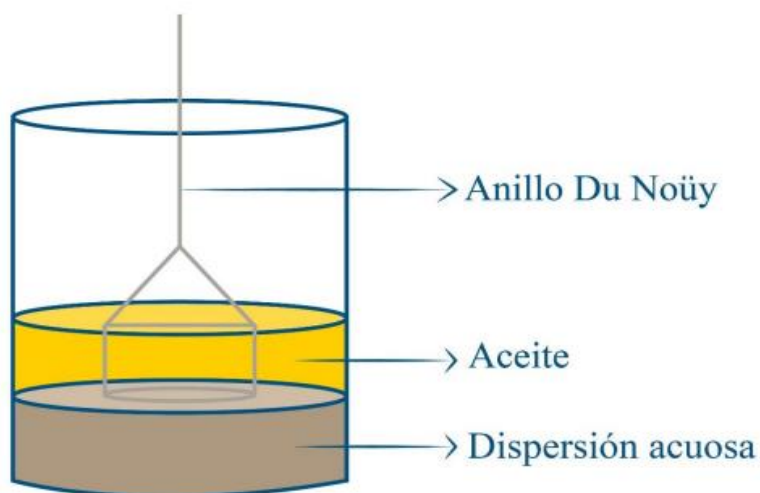


Figura 3.3. Representación gráfica de la geometría de anillo Du Noüy en la interfase aceite/agua para la determinación de la tensión interfacial de equilibrio y de la reología interfacial (Henaó, 2021).

3.2.5' Determinación de la tensión interfacial

La tensión interfacial en la interfase aceite/agua, se midió utilizando un tensiómetro automatizado de equilibrio Lauda TD3 LMT 850 asociado una unidad

termostática Peltier para el control de la temperatura. La medición se realizó empleando un anillo Du Noüy previamente sumergido en una solución de etanol, lavado varias veces con agua destilada, y, por último, flameado a la llama con un mechero Bunsen para eliminar impurezas. Las fracciones de okara y ISPS se dispersaron en buffer citrato de sodio 10mM a una concentración de 1% m/V), realizando también diluciones a 1, 0,5, 0,25, 0,1, 0,05, 0,025 y 0,005% m/V. Estas diluciones permitieron generar la curva de solubilidad trabajando a valores de pH de 3,0 y 4,5. Antes de comenzar la medición automatizada, se ajustó la temperatura a 25°C y la diferencia de densidad entre las dispersiones acuosas y oleosas. Luego, se colocaron 20ml de dispersión en un cristizador de vidrio provisto por el equipo y se sumergió el anillo Du Noüy en el seno de la dispersión hasta colocarlo en una posición cercana a la interfase. Posteriormente, se añadieron cuidadosamente 20ml de aceite de girasol completando la interfase (**Figura 3.3**). Por último, se midió la tensión interfacial cada minuto y las medidas se optimizaron en el tiempo hasta llegar al valor de equilibrio (γ^e). La medición del buffer citrato se realizó a los mismos pH como control de partida (γ^0). La presión superficial de equilibrio (π_e) se calculó como:

$$\pi_e = \gamma^0 - \gamma^e \text{ (Ec 3.4)}$$

γ_0 es la tensión interfacial del buffer citrato de sodio 10mM, ajustada al mismo pH que el de la dispersión acuosa.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Dependencia de la solubilidad proteica con el pH

La fracción S-OK contiene un mayor contenido de proteína total (**Tabla 2.1**) probablemente debido al proceso de sonicación previo al tratamiento a pH 9,0, que aumentó sustancialmente la tendencia de las fracciones de proteína 11S a precipitar. La presencia de estas proteínas también pudo demostrarse analizando el perfil de solubilidad de la fracción S-OK (**Figura 3.4**), que fue comparable con el comportamiento de las fracciones de soja analizadas por Kimura (2008). La muestra S-OK fue la única que mostró una curva de solubilidad de pH en forma de U, con una solubilidad mínima en el punto isoeléctrico (pI ~4,5) de las proteínas de almacenamiento en semillas de soja (Pearson, 1983). El perfil de solubilidad de la fracción S-OK fue superior en toda la escala de pH analizada, en comparación con las observadas en OK y OK-S (**Figura 3.4**). Estas últimas fracciones presentan proteínas prácticamente insolubles con un mayor peso molecular. Estos resultados permitirían demostrar la presencia de proteínas de reserva 11S que precipitaron formando agregados reversibles a través de interacciones no covalentes (interacciones débiles y/o enlaces de hidrógeno o hidrofóbicos) debido al proceso de sonicación (Karshikoff, 2006; Moscoso Ospina et al., 2022).

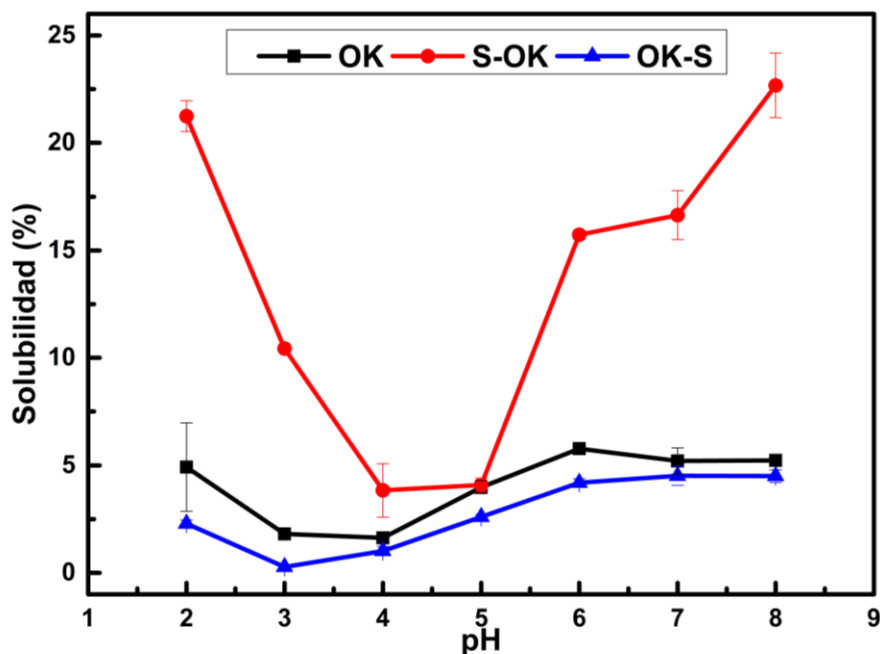


Figura 3.4. Dependencia del pH en la solubilidad de las proteínas presentes en las muestras de okara de soja (OK, S-OK y OK-S). Los valores se expresaron como la media de tres mediciones independientes ($n = 3$) \pm desviación estándar.

Por otro lado, respecto a las fracciones ISPS, todas las fracciones aumentaron su solubilidad en el pI (**Figura 3.5**) con respecto a sus fracciones de partida (**Figura 3.4**). En general el aumento de solubilidad de proteína fue aproximadamente del 5% al 10% en todos los rangos de pH con respecto a las fracciones OK y OK-S, probablemente debido a la modificación estructural de las proteínas producto de la hidrólisis ácida iniciada durante el proceso de autoclave. Esta hidrólisis produciría una disociación de las estructuras oligoméricas de la glicinina y un despliegue simultáneo de las cadenas

polipeptídicas de las subunidades AB. Se debe tener en cuenta que la glicinina (proteína tipo 11S), una de las principales globulinas de las semillas de soja, tiene una estructura hexámera $(AB)_6$ con un peso molecular de alrededor de 360kDa en su estado nativo. Su estructura cuaternaria está estabilizada por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas y por puentes disulfuro entre los polipéptidos A y B (Peng et al., 1984). La hidrólisis de estas estructuras mejoraría notablemente la solubilidad y las propiedades tensioactivas de las fracciones obtenidas (Kim y Kinsella, 1987a,b). Otro factor que puede tener incidencia en el mencionado aumento de solubilidad (**Figura 3.4 y 3.5**), puede relacionarse con la presencia de un proceso de desamidación generado por las condiciones de pH ácido y elevada temperatura y presión, a las que se someten los okaras para la obtención de las respectivas fracciones ISPS. Esta desamidación podría ser comprobada por la disminución de la señal amida II en las fracciones de polisacáridos insolubles de soja con respecto a okara (**Ítem 2.4.4**). Este tipo de reacción sobre las proteínas de soja, informada previamente por Wagner y Guéguen (1995), además de aumentar la solubilidad de la glicinina, tendría un efecto directo sobre la cinética de adsorción en la interfase y la mejora de sus propiedades emulsificantes.

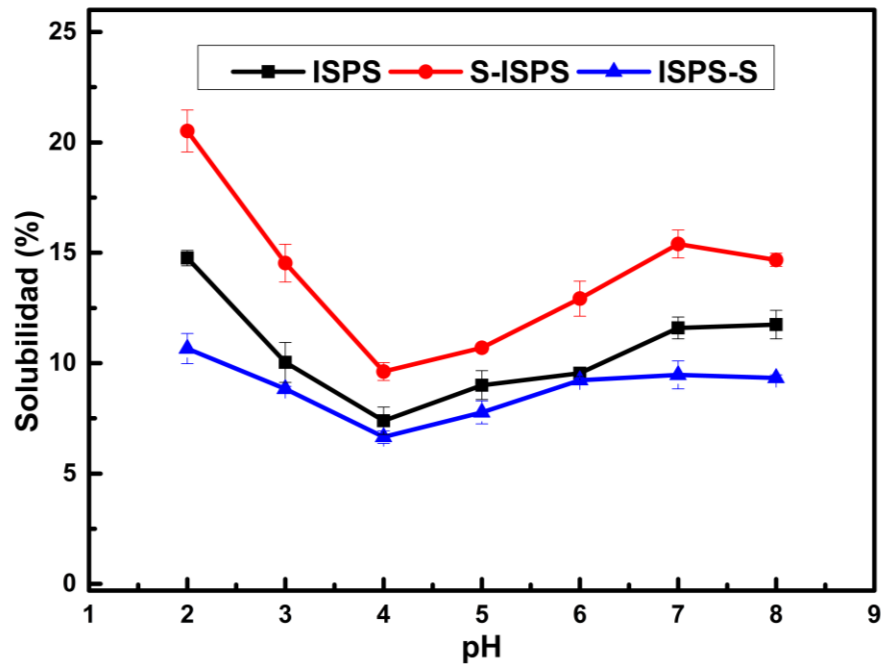


Figura 3.5. Dependencia del pH en la solubilidad de la proteína para muestras de (ISPS, S-ISPS e ISPS-S) Los valores se expresaron como la media de tres mediciones independientes ($n = 3$) \pm desviación estándar.

3.3.2' Dependencia de la presión y la tensión interfacial con el pH

El efecto de las muestras de okara (OK, S-OK, OK-S) sobre la tensión interfacial (γ_e) de los diferentes sistemas dispersos, y por consiguiente, de su presión interfacial de equilibrio (ρ_e), se muestran en la **Figura 3.6**. Las tres muestras redujeron la tensión interfacial aceite/agua con el aumento de la concentración (% m/m) hasta llegar a la saturación de la interfase a valores de 1% m/m. Estos resultados indicarían que las

muestras de okara presentan una potencial actividad emulsionante, formando una película interfacial protectora durante el proceso de homogeneización protegiendo las gotas en emulsiones O/W y evitando la colisión entre ellas (Moscoso Ospina et al., 2022). En particular, la dispersión de S-OK a pH 3,0, presentó los valores más altos de presión interfacial (**Figura 3.6b**). En este caso, la presencia de subunidades proteicas 11S migrando hacia la interfase, generarían esta diferencia significativa respecto a las otras muestras de okara. Por otro lado, se puede resaltar, que las fracciones de okara aun estando en su pH isoelectrico, mostraron una disminución en la tensión interfacial γ_e , este dato resulta interesante teniendo en cuenta que teóricamente las proteínas de reserva de la soja tienden a agregarse a este pH, dificultando su actividad funcional (Molina y Wagner, 2002).

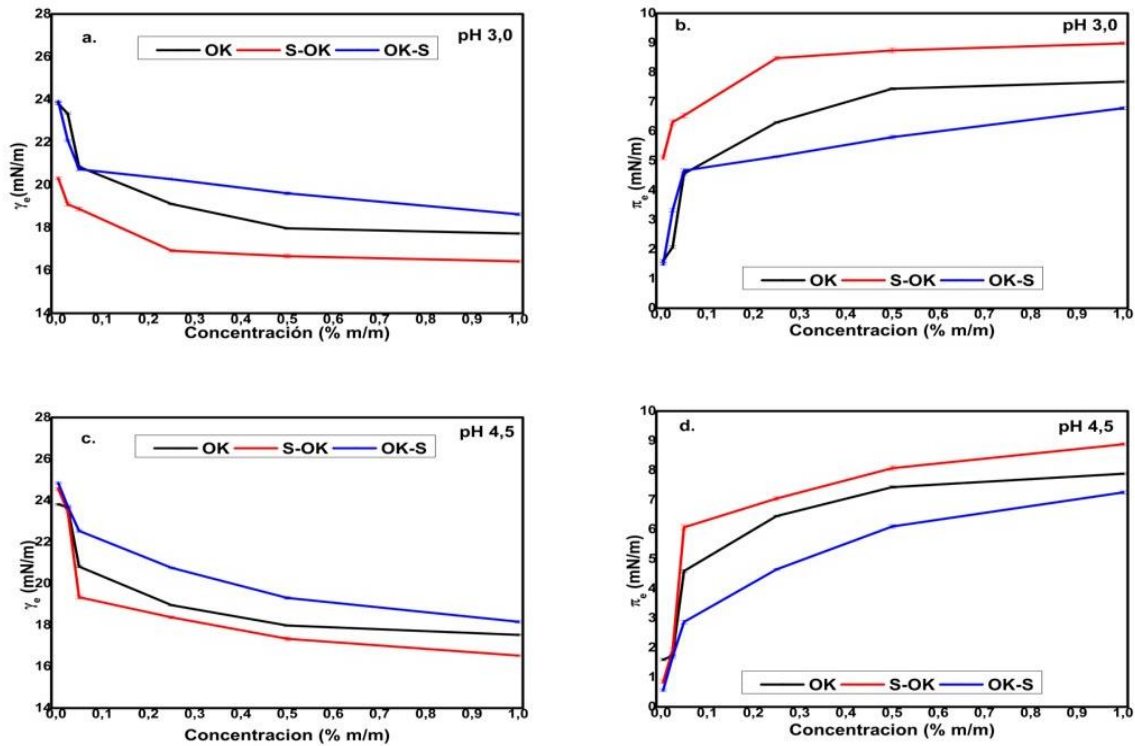


Figura 3.6. Dependencia de la tensión y la presión interfacial en el equilibrio para muestras de okara ($n = 3$). Curvas de tensión interfacial en el equilibrio vs. concentración (% m/m) a pH 3,0 (a) y pH 4,5 (c), y Curvas de la presión interfacial en el equilibrio vs. concentración(% m/m) a pH 3,0 (b) y pH 4,5 (d).

El efecto de las muestras ISPS (ISPS, S-ISPS, ISPS-S) sobre la tensión interfacial γ_e y la presión interfacial en el equilibrio π_e , se muestran en la **Figura 3.7**. Todas las dispersiones tuvieron un aumento significativo de la presión interfacial π_e . Se puede observar que las tres muestras de ISPS presentaron un comportamiento similar entre sí, incluso sin un efecto marcado por el empleo de dos condiciones de pH diferentes. En

comparación con las muestras de okara, las dispersiones de ISPS permitieron un descenso más rápido de la tensión interfacial en función de la concentración, permitiendo un descenso de dicho parámetro, en todas las condiciones, hasta valores inferiores a 16 mN/m. Las fracciones de polisacáridos insolubles presentarían estructuras proteicas con una mayor facilidad de difusión, desplegamiento y reacomodamiento en la interfase. En este sentido, el comportamiento interfacial, relacionado con el acomodamiento de las partículas en la interfase agua/aceite, son fundamentales para estudiar y predecir el comportamiento de este tipo de estructuras actuando como agentes emulsificantes. Estos resultados permiten inferir que las fracciones ISPS también presentarían un potencial para ser aplicados como agentes emulsificantes (Porfiri et al., 2017).

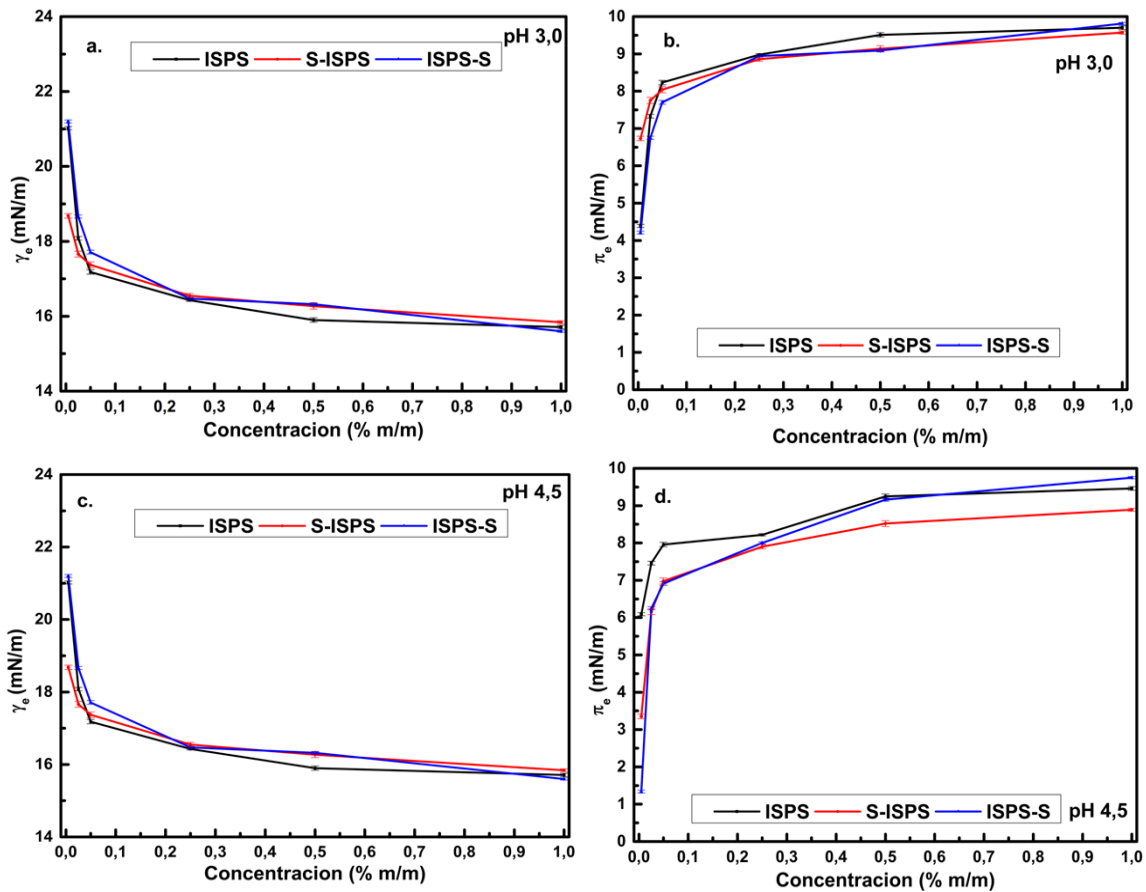


Figura 3.7. Dependencia de la tensión y la presión interfacial en el equilibrio para muestras ISPS ($n = 3$). Curvas de tensión interfacial en el equilibrio vs. concentración (% m/m) a pH 3,0 (a) y pH 4,5 (c), y Curvas de la presión interfacial en el equilibrio vs. concentración (% m/m) a pH 3,0 (b) y pH 4,5 (d).

3.3.3 Dependencia del potencial- ζ con el pH

El pH es uno de los factores que más afecta a la carga de las partículas en dispersión y por ende al valor del potencial- ζ (Hunter, 2011). Esta variación en función

del pH, depende de la cantidad de grupos ionizables y el pKa de moléculas de proteínas y polisacáridos (Henaó, 2021). Teóricamente, si la magnitud del potencial- ζ de las partículas en dispersión exhibe valores mayores de +30mV o menores de -30mV, tenderán a repelerse entre sí y las dispersiones se consideran estables. Los valores de potencial- ζ expresados en mV para fracciones de okara e ISPS, a pH 3,0 y pH 4,5, se exhiben en la **Figura 3.8**. Todas las fracciones en estos rangos de pH presentaron valores de potencial negativos, a excepción de la muestra S-OK a pH 3,0. Esta marcada diferencia podría relacionarse con la presencia de las subunidades proteicas 11S, presentes en esta fracción y en una condición por debajo del pI (Moscoso Ospina et al., 2022). A pH 4,5, las diferentes fracciones presentaron un marcado descenso hacia potenciales más negativos. Como era de esperar, la carga positiva de las proteínas de reserva que se encontraban en la fracción S-OK, se anularon ante la condición de pH isoeléctrico en el medio de dispersión. A nivel de la estabilidad de las dispersiones, a pH 3,0 las fuerzas de atracción electrostáticas serían lo suficientemente importantes para generar la presencia de agregados. Por otro lado, a pH 4,5 podrían obtenerse dispersiones de mayor estabilidad utilizando particularmente las fracciones ISPS.

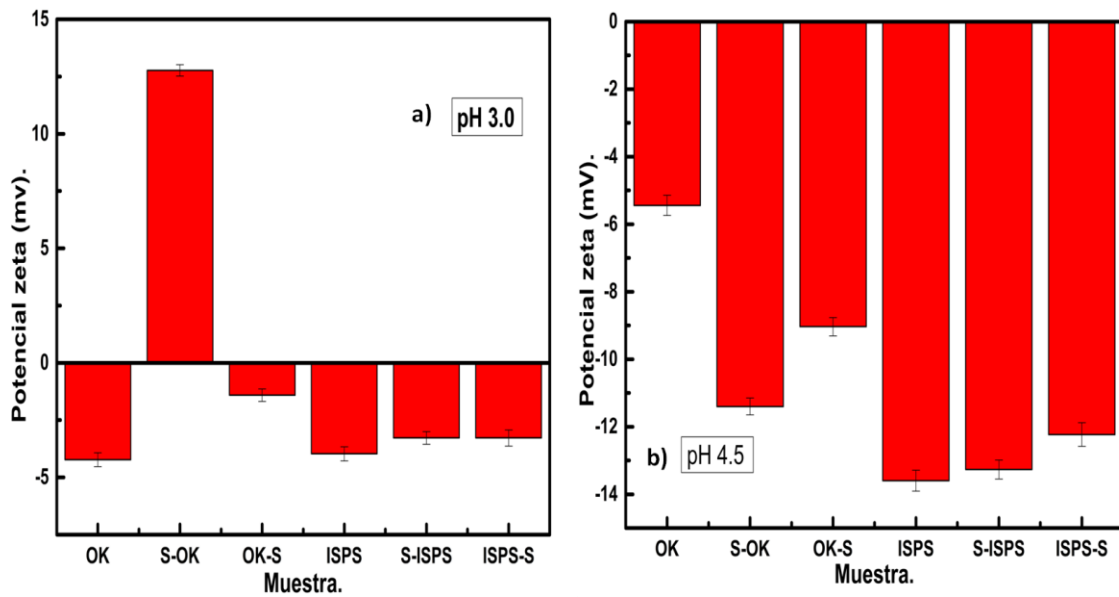


Figura 3.8. Dependencia del potencial zeta (ζ) con el pH para muestras de okara y ISPS ($n = 3$) \pm desviación estándar. a) pH 3,0, b) pH 4,5.

3.3.4' Reología interfacial

El comportamiento interfacial de las dispersiones de okara también se evaluó determinando la viscosidad compleja (η^*) en función del tiempo **Figura 3.9**. Un aumento de η^* , que rápidamente forma una meseta, indica una rápida adsorción de macromoléculas en la interfase aceite/agua induciendo una estructura interfacial similar a la de un gel (Baldursdottir et al., 2010). En este sentido, las dispersiones S-OK promovieron una película con una mejor estructura viscoelástica (valores η^* más altos) que las muestras OK y OK-S. Este aumento de η^* , podría atribuirse al comportamiento mencionado previamente de las estructuras proteicas relacionadas a las fracciones

proteicas 11S presentes en la muestra S-OK (Amine et al., 2014), a la acción de los polisacáridos que modifican la estructura del film interfacial al interactuar directamente con la interfase a través de la presencia de estructuras glicoproteicas y/o en la generación de capas externas. Por otro lado, el análisis de los valores de η^* evidenció una diferencia significativa en función del pH (**Figura 3.9_b**). En este sentido, se observó una caída en los valores de viscosidad a pH 4,5, la cual puede relacionarse con una menor interacción electrostática, a nivel de la interfase, entre las proteínas y los polisacáridos, sumada a una menor actividad de estructuras proteicas que poseen un pH isoelectrico en esas condiciones.

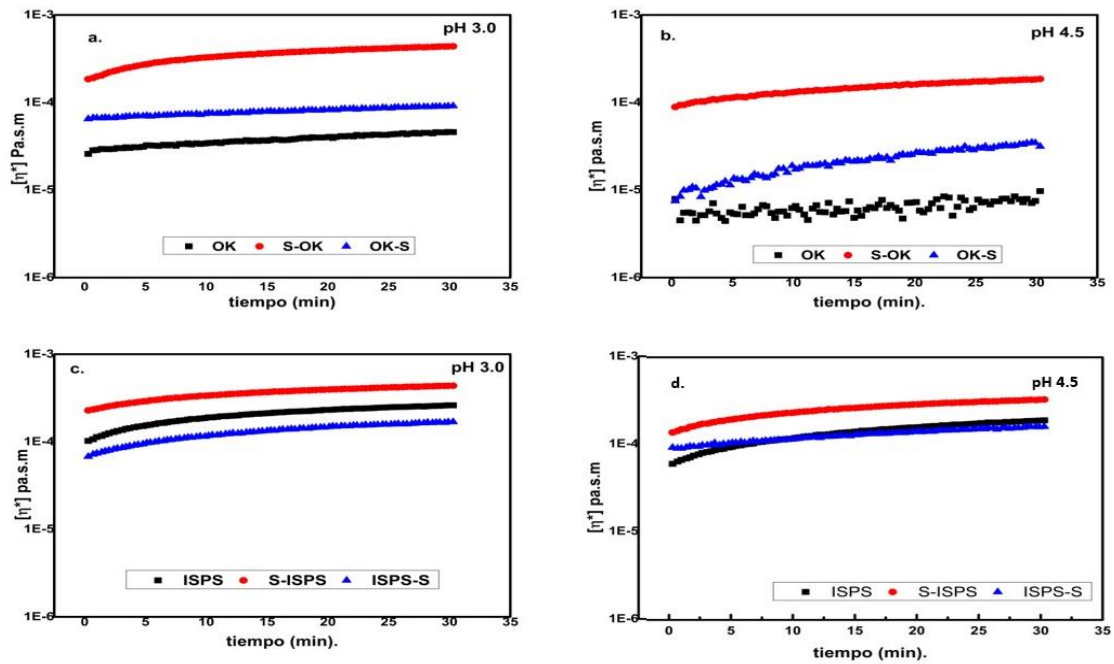


Figura 3.9. Viscosidad compleja $[\eta^*]$ en el tiempo para muestras de okara (4,0% m/m) a) pH 3,0 y b) pH 4,5) e ISPS (2% m/m) pH 4,5 (c) pH 3,0 y d) pH 4,5). Valores medios ($n = 3$).

El comportamiento reológico interfacial para fracciones ISPS se muestra en la **Figura 3.9**. En todos los casos, las fracciones ISPS presentaron mayores valores de η^* que la muestra de okara correspondiente, a excepción de la muestra S-ISPS donde la tendencia fue similar. Esto se relaciona a la propiedad de las fracciones de polisacáridos insolubles de soja para generar películas interfaciales con propiedades viscoelásticas acordes a la de un agente emulsificante de buenas características funcionales. Este comportamiento, no dependiente del pH, puede relacionarse a la disminución del contenido de proteínas de reserva y a la actividad de los polisacáridos cumpliendo el rol de generar capas alrededor de la interfase proteica, modificando positivamente la rigidez de la misma. Esta actividad de los polisacáridos estaría en relación con el aumento de zonas hidrofóbicas expuestas durante el tratamiento de homogeneización mediante sonicado de alta energía (Ngouémazong et al., 2015).

3.4 Conclusiones parciales

- ✓ La muestra S-OK fue la única que presentó una curva de solubilidad en función del pH tipo U, presentando la menor solubilidad en el punto isoeléctrico de las proteínas de reserva (pI ~4,5). S-OK mostró una solubilidad asociada, principalmente, al elevado contenido de estructuras proteicas relacionadas con la glicinina (11S). Las curvas de las fracciones OK y OK-S, demostraron la

- presencia de proteínas prácticamente insolubles. Estos resultados permiten inferir que las proteínas de reserva precipitan, formando agregados reversibles a través de interacciones no covalentes durante el proceso de sonicación.
- ✓ Las fracciones ISPS presentaron una mayor solubilidad que las fracciones de okara correspondientes. El aumento de la solubilidad proteica estaría ligado a diversos factores como la hidrólisis proteica y/o a la desamidación de dichas estructuras bajo condiciones ácidas fuertes, elevada temperatura y presión.
 - ✓ Las fracciones de okara redujeron la tensión interfacial aceite/agua con el aumento de la concentración hasta llegar a la saturación de la interfase utilizando 1% m/m de cada fracción. En particular, la dispersión de S-OK a pH 3,0, presentó los valores más altos de presión interfacial. Las subunidades 11S presentes en esta fracción, migrarían de forma más eficiente hacia la interfase actuando como agentes tensioactivos.
 - ✓ Las dispersiones de ISPS, a bajas concentraciones, presentaron una alta capacidad para aumentar su actividad interfacial. respecto a las fracciones de okara. Dichas dispersiones, también permitieron una reducción importante en los valores de tensión superficial en el equilibrio. En comparación con las fracciones ISPS y ISPS-S, la fracción S-ISPS presentó una menor actividad tensioactiva a 4,5,

- debido a un efecto negativo de la condición de pH sobre parte de sus estructuras proteicas.
- ✓ Todas las fracciones presentaron valores de potencial- ζ negativos a pH 3,0 y 4,5 a excepción de la muestra S-OK a pH 3,0. Esto debido a las subunidades 11S presentes en esta fracción. Los valores absolutos de fueron menores en todos los casos a 15mV, esto quiere decir, que las fuerzas de repulsión son menores que las de atracción.
 - ✓ Las dispersiones S-OK y S-ISPS promovieron la formación de un film más resistente (valores η^* más altos) con respecto a las otras fracciones. Este aumento de η^* podría atribuirse a una buena actividad emulsionante, debido a un mayor contenido de proteínas y/o a la acción de los polisacáridos que modifican la estructura de la película al interactuar directamente en la interfaz (mediante estructuras glicoproteicas) o en la formación de capas externas.

Capítulo 4

Formulación y estabilización de emulsiones O/W

4 Emulsiones

Una emulsión es una dispersión termodinámicamente inestable de dos o más líquidos inmiscibles o parcialmente miscibles, en la cual, uno de los líquidos se dispersa en forma de pequeñas gotas esféricas. Las emulsiones se clasifican de acuerdo con la distribución de las fases oleosa y acuosa. La sustancia que forma las gotas en una emulsión se conoce como fase dispersa o interna, mientras que la sustancia que se encuentra como líquido circundante se denomina fase continua o externa. En la mayoría de las emulsiones alimentarias, los diámetros de las gotas se encuentran entre 0,1 y 100 micrones (Dickinson y Stainsby, 1982; Walstra, 1996a). Un sistema que consta de gotas de aceite dispersas en una fase acuosa se conoce como emulsión aceite en agua (oil-in-water, O/W), mientras que un sistema que consta de gotas de agua dispersas en una fase oleosa se denomina emulsión agua en aceite (water-in-oil, W/O) (Dickinson y McClements, 1995).

4.1 Coloides

Los coloides son dispersiones de dos o más materiales inmiscibles, donde la longitud característica de las inclusiones (partículas) se encuentra entre 1nm y 1 μ m. Sin embargo, en los alimentos, el término "coloides" generalmente incluye dispersiones que contienen partículas más grandes. Una propiedad clave que presentan estos alimentos es la presencia de un gran número de partículas, con la consiguiente elevada área interfacial presente entre las partículas y la fase continua. Las propiedades de los coloides

alimentarios están dominadas por las partículas y sus interacciones, que a su vez están controladas por las propiedades de la región interfacial.

4.1.1' Tipo de emulsiones

Las emulsiones alimentarias pueden ser sistemas simples (O/W o W/O), o múltiples, en las que la fase dispersa ya es una emulsión (W/O/W, O/W/O). A menudo, contienen una mezcla compleja de ingredientes que incluyen proteínas, polisacáridos, otro tipo de emulsionantes, sales, agua y aceite. Cada uno de estos ingredientes contribuye a las propiedades generales de la emulsión.

4.1.2' Factores que afectan la estabilidad de la emulsión

Las emulsiones O/W pueden desestabilizarse por tres mecanismos principales: cremado, agregación y coalescencia. El proceso de cremado se refiere al ascenso de las gotas de aceite hacia la zona superior de la emulsión, el agrupamiento de dos o más gotas es llamado agregación y por último la coalescencia que ocurre cuando las gotas originales pierden sus identidades y se funden en gotas más grandes reduciendo el área de interface total (Dickinson, 1997; McClements, 2004; Tangsuphoom & Coupland, 2008). Algunos de los factores y su influencia, son explicados a continuación:

Tamaño de gota y distribución del tamaño de la gota: La estabilidad de una emulsión puede ser medida como la función del comportamiento del número de gotas presentes en función del tiempo, gotas muy pequeñas forman emulsiones más estables en comparación de las gotas más grandes dado que tienen una mayor probabilidad a la agregación y coalescencia. Además, las gotas dispersas aumentarán su tamaño en relación al número de colisiones, siendo un factor determinante la distribución de estas y el tiempo de residencia (Nylander et al., 2008).

Viscosidad de las emulsiones: La viscosidad de las emulsiones puede ser sustancialmente más alta que la viscosidad de ya sea el aceite o el agua. Esto es debido a que las emulsiones muestran comportamientos no-Newtonianos causados por el desplazamiento de la gota o viscosidad estructural. Una viscosidad elevada de la fase continua disminuye la frecuencia de colisiones entre las gotas dispersas y por tanto la energía de colisión, resultando favorable a la para estabilidad de la emulsión (Nylander et al., 2008).

Film interfacial: Las emulsiones son estabilizadas por películas que se forman alrededor de las gotas de agua en la interface aceite/agua. Esas películas resultan de la adsorción de moléculas anfifílicas de alto peso molecular que son activas interfacialmente (por ejemplo, exhiben comportamiento como surfactante) (Nylander et al., 2008).

pH y fuerza iónica: Las interacciones atractivas y repulsivas entre proteínas y polisacáridos dependerán de factores tales como el pH y la fuerza iónica del sistema. Por debajo del pI de las proteínas y con polisacáridos catiónicos, tales como el quitosano, en general ocurrirán interacciones repulsivas, mientras que por encima del pI ocurrirán interacciones atractivas formando complejos coacervados (Dickinson, 2003).

4.1.3 Formación

El proceso de convertir dos líquidos inmiscibles en una emulsión se conoce como homogeneización, y el dispositivo mecánico diseñado para llevar a cabo este proceso se denomina homogeneizador. Para distinguir entre la naturaleza de los materiales de partida, es conveniente dividir la homogeneización en dos categorías. La formación de una emulsión directamente a partir de dos líquidos separados se definirá como homogeneización primaria (emulsión gruesa), mientras que la reducción del tamaño de las gotas en una emulsión existente se definirá como homogeneización secundaria (emulsión fina). La creación de un tipo particular de emulsión alimentaria puede implicar el uso de cualquiera de estos tipos de homogeneización o una combinación de ambos. Por ejemplo, la preparación de un aderezo para ensaladas en la cocina se realiza por homogeneización directa de las fases acuosa y oleosa y, por tanto, es un ejemplo de homogeneización primaria, mientras que la leche homogeneizada se fabrica reduciendo el tamaño de los glóbulos de grasa de la leche cruda y también lo es un ejemplo de homogeneización secundaria. En muchas operaciones de procesamiento de alimentos y

estudios de laboratorio, es más eficiente preparar una emulsión en dos pasos (McClements, 1999).

El proceso de formación de una emulsión es claramente una etapa crítica en la estabilidad futura de la misma. Los principales factores que determinan la "calidad" de la emulsión recién formada son: (1) la adsorción de emulsionantes a la superficie de la gota; (2) el proceso de homogeneización utilizado; y (3) la estabilidad del film interfacial (Robins y Wilde. 2003).

4.1.4' Caracterización y Propiedades de Coloides y Emulsiones

4.1.4.1' Tamaño de partícula

El tamaño de las partículas o gotas dispersas es un factor clave en las propiedades y estabilidad de la emulsión. Las partículas en los alimentos coloidales son generalmente muy polidispersas, con un factor de 10 o más entre los tamaños de las partículas más grandes y las más pequeñas. Por lo tanto, es muy importante generar una distribución de tamaño de partícula óptima para cada producto y asegurarse de que la misma no cambie durante su almacenamiento.

Típicamente, en la industria alimentaria, las emulsiones O/W contienen gotas de aceite con un diámetro en el rango de 0,5-2 μ m, y las emulsiones W/O, como los productos para untar, presentan gotas de agua de hasta 20 μ m. Las partículas sólidas dispersas, como los cristales de azúcar en el chocolate, tienen un diámetro en el rango de

0,1 a 50 μm , aunque una sensación “arenosa” es detectable cuando las partículas superan los 20 μm (Robins & Wilde, 2003).

4.1.4.2' Estabilidad

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, con el tiempo suficiente, estos sistemas se separarán en sus fases iniciales. Sin embargo, se puede lograr una estabilidad del tipo cinética, pudiendo formular alimentos que permanezcan comparativamente estables durante la vida útil requerida. Está claro que la presencia de un proceso de cremado, generando una reorganización física de las gotas, podría ser reversible, mientras que la presencia de un proceso de coalescencia generaría un deterioro irreversible del producto emulsificado (Robins & Wilde, 2003). En lo referente a la formación de flóculos, el desarrollar una emulsión estable a la floculación permite evitar la coalescencia, debido a la mayor probabilidad de interacción entre gotas que se presentan en ese tipo de estructuras agregadas. Sin embargo, ciertos aditivos utilizados en los alimentos, por ejemplo, los agentes estabilizantes (principalmente polisacáridos), pueden causar la floculación de las gotas impartiendo una textura particular y deseada al alimento.

4.1.4.3 Reología

Las propiedades reológicas de las emulsiones son importantes, tanto durante el procesamiento como en el producto final, siendo un componente importante de la sensación en la boca de las diferentes emulsiones alimentarias. La respuesta de la emulsión al estrés mecánico puede imitar líquidos simples, como las emulsiones diluidas (ej. leche) o, en el otro extremo, pueden diseñarse para impartir una textura sólida, como en los aderezos (Robins y Wilde, 2003).

Las propiedades reológicas están controladas principalmente por la concentración y el tamaño de las gotas y por la composición de la fase continua. Las emulsiones de baja concentración de gotas, donde las gotas no están floculadas y la fase continua es un líquido simple, tendrán una viscosidad baja y constante a una temperatura dada (comportamiento newtoniano). A medida que aumenta la concentración de gotas y/o se produce un proceso de floculación de gotas, la emulsión se vuelve progresivamente un sistema no newtoniano. Su respuesta al flujo depende ahora de la magnitud de la tensión aplicada y de las escalas de tiempo de aplicación (Dickinson, 1998).

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Preparación de las emulsiones O/W

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

4.2.1.1 Emulsiones gruesas

Se utilizaron las fracciones OK, S-OK y OK-S en porcentaje (2 y 4% m/m) en buffer citrato de sodio 10mM, ajustando el pH a 3,0 y 4,5, con y sin el agregado de sales (CaCl₂ o NaCl, 20mM) (Moscoso Ospina et al., 2022). Con posterior adición de azida de sodio al 0,03% m/V, para evitar la proliferación de microorganismos ambientales. Estas fibras de okara en dispersión, se dejaron en suspensión por un periodo de 24 horas, para favorecer la adsorción de compuestos de superficie y la correcta hidratación de dichas fracciones. Posteriormente a este procedimiento, las dispersiones se agitaron en agitador magnético durante 10min (50rpm, 25°C) para ser incluidas como fase dispersante. Para la preparación de emulsiones O/W, se utilizó aceite refinado de girasol (Molino Cañuelas, Cañuelas, Argentina) en una fracción másica (ϕ_m) de 0,3. Estas se realizaron utilizando un homogeneizador tipo rotor/estator Ultraturrax T-25 (20.000rpm, 2min) (IKA Labortechnik, Staufen, Alemania), empleando recipientes de policloruro de vinilo (PVC) de 30mm de diámetro interno.

4.2.1.2 Emulsiones finas

Las emulsiones finas se obtuvieron por sonicación de las preemulsiones o emulsiones gruesas (**ítem 4.2.1.1**), empleando un homogeneizador ultrasónico de alta intensidad Sonic Vibracell 750VCX (Sonic & Materials Inc.; Newton, E.E.U.U). El proceso de sonicación se llevó a cabo con un tiempo efectivo de 2min (con secuencias on/off de 15s), operado a 75% de amplitud. Durante la homogeización ultrasónica, el vaso conteniendo la preemulsión se introdujo en un baño de agua hielo para permitir la disipación eficiente del calor generado durante el proceso.

Por otro lado, a diferencia de las fracciones de okara, las dispersiones de ISPS, S-ISPS e ISPS-S, se realizaron con una concentración de 1 y 2% m/m. Las concentraciones utilizadas para estas fracciones, se seleccionaron según trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación (Porfiri et al., 2017; Vaccaro. 2016; Fortunato, 2018).

4.2.2 Distribución de tamaño de partícula (DTP)

La DTP de las emulsiones se determinó por dispersión estática de luz empleando un analizador de tamaño de partícula Malvern Mastersizer 2000-E (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido) asociado a una unidad de dispersión por vía húmeda (Hydro 2000 MU). Las medidas se realizaron utilizando agua como dispersante y la velocidad de la hélice agitadora en la unidad dispersora fue de 2000rpm. Para llevar a cabo las mediciones, se agregó emulsión hasta alcanzar un nivel de turbidez adecuado.

Los parámetros ópticos empleados para la conversión del patrón angular de dispersión de luz en la DTP fueron: índice de refracción del dispersante: 1,33, índice de refracción de la fase dispersa (aceite de girasol): 1,47 y coeficiente de absorción: 0,001. Además, se realizó una medida adicional después de 2min de sonicación a 40W con una sonda de baja energía presente en el equipo. Este procedimiento es adecuado para romper los flóculos presentes en emulsiones preparadas con muestras ricas en polisacáridos (Higashitani et al., 1993; Porfiri et al., 2017). Las medidas experimentales se realizaron para las emulsiones gruesas (1, 30 y 60min) y para las emulsiones finas (1, 14 y 28días). A partir de las DTP de las emulsiones sin y con tratamiento previo de sonicación, se obtuvieron los diámetros promedios de De Brouckere (D 4,3). Finalmente, el grado de floculación (GF) se obtuvo a partir de la expresión:

$$GF = \frac{D[4,3] - D[4,3]_{\text{Sonicado}}}{D[4,3]_{\text{Sonicado}}} \text{(Ec 4.1)}$$

Donde $D[4,3]$ y $D[4,3]_{\text{Sonicado}}$ son los diámetros ponderados por volumen, medidos antes y después del tratamiento de ultrasonido, respectivamente.

4.2.3' Cinética de cremado

El análisis de la cinética de separación gravitacional para las emulsiones gruesas de OK, S-OK y OK-S se realizó utilizando tubos graduados (10ml). Dichas emulsiones,

inmediatamente después de ser preparadas, se trasvasaron a dichos tubos, se mantuvieron en posición vertical y de manera visual se reportó el volumen de fase acuosa separada (V_{FA}) cada 15min hasta un tiempo final de 60min. El cálculo del porcentaje de fase acuosa %FA se realizó con respecto al volumen total de la emulsión (V_E) según la **Ec 4.2**. (Porfiri et al., 2017).

$$\%FA = \frac{V_{FA}}{V_E} \times 100 \quad (\text{Ec 4.2})$$

Donde V_E es el volumen de la emulsión en el tubo graduado y V_{FA} es el volumen de la fase acuosa separada.

4.2.3.1 Evaluación de la estabilidad global en condiciones estacionarias por dispersión múltiple de luz

La estabilidad global de las emulsiones finas, formuladas con las diferentes fracciones de okara e ISPS, se determinó por dispersión de luz en un analizador vertical de barrido Turbiscan Lab (Formulation, Francia) a una longitud de onda ($\lambda=850\text{nm}$). Para realizar dicho análisis, las emulsiones se colocaron en celdas cilíndricas (80mm) y se registraron los valores de transmitancia (T%) y retrodispersión de la luz o backscattering (BS%) en función de la altura de la celda. Estas emulsiones fueron almacenadas durante 28 días, realizando mediciones en forma semanal.

Para evaluar la estabilidad de las emulsiones se determinó el índice de estabilidad de Turbiscan (TSI). El TSI es un cálculo basado en los datos brutos que obtiene el

analizador a partir de los valores de transmitancia (T%) y backscattering (BS%), obteniendo como resultado un único número que refleja la desestabilización del sistema disperso. Cuanto mayor es el valor de TSI, mayor es la desestabilización en la muestra. El TSI se calculó como:

$$\text{TSI} = \sum_i \frac{\sum h |\text{Barrido}_i(h) - \text{Barrido}_{i-1}(h)|}{H} \quad (\text{Ec 4.3})$$

Donde el Barrido $_i(h)$ es la transmitancia del i -ésimo barrido a una altura de h , y H es la altura total de la muestra medida (Wang, Li, & Zhang, 2018).

4.2.4 Comportamiento de flujo

El comportamiento de flujo de las emulsiones finas se realizó empleando un reómetro AR-G2 (TA Instruments, Waters LLC; Newcastle, DE, EE. UU.) asociado a una geometría cono-plato (diámetro 40mm y ángulo 2°; gap = 1000 μ m). Los ensayos se realizaron a una velocidad de deformación entre 0,01 a 200s⁻¹ y a una temperatura de 25 \pm 1°C, luego se realizó un ensayo de loop a 200s⁻¹ durante 1min, hasta un descenso a 0,01S⁻¹ controlado mediante un baño termostatzado (Julabo ACW100, Julabo Labortechnik; Seelbach, Alemania) adaptado al reómetro. Antes del inicio de los ensayos, todas las emulsiones se dejaron en reposo durante 2min para equilibrar la temperatura.

Las determinaciones se realizaron por triplicado y las curvas de flujo se ajustaron al modelo reológico de Herschell-Bulkley:

$$\tau = \tau_0 + k\dot{\gamma}^n \text{(Ec 4.3)}$$

Donde, $\dot{\gamma}$ es velocidad de deformación (s^{-1}) los parámetros K ($Pa \cdot s^n$) y n (sin unidades) son los índices de consistencia y de comportamiento de flujo y τ_0 umbral de fluencia (Pa), respectivamente (Muller, 1973).

4.2.4.1 Reología oscilatoria

La reología oscilatoria de las emulsiones finas se estudió utilizando un reómetro AR-G2 (TA Instruments; New Castle, DE, EE. UU.) con geometría de placas paralelas (gap de 500 μ m, diámetro de 40mm). La temperatura ($25^\circ C$) se controló con un baño de agua (Julabo ACW100, Julabo Labortechnik, Alemania) asociado al reómetro. Los datos experimentales se obtuvieron registrando el módulo complejo G^* (Pa) y la viscosidad compleja ($Pa \cdot s$) en función de la frecuencia de oscilación (rango 0.6-628Rad/s) dentro del rango de viscoelasticidad lineal previamente determinado por barridos de deformación (1%).

4.2.5 Microscopía óptica.

La microestructura de las emulsiones formuladas con las fracciones de okara fue analizada a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ C$) con un microscopio óptico con un aumento de

40x con una dilución 1:1 para emulsiones gruesas y 1:3 para emulsiones finas. Para obtener las micrografías, se adaptó una cámara digital (Electronic Eyepiece, Hangzhou Future Optics Sci. & Tech. Co., Ltd.; Hangzhou, China)

4.2.5.1 Evaluación de la microestructura

Para evaluar la microestructura de las emulsiones de ISPS, se tomaron alícuotas de 10 μ l de emulsión y posteriormente se diluyeron en proporción 1:10(V/V). Las emulsiones diluidas se colocaron en un porta objetos (75mm \times 25mm) y se cubrieron cuidadosamente con un cubreobjeto (22mm \times 22mm). Las observaciones se realizaron empleando un lector multimodal de imagen Cytation 5 (BioTek Instruments, Inc.; Winooski, VT, EE. UU.), con un aumento de 100 \times y 200 \times . Las imágenes se procesaron con software Gen 5 (R) asociado al equipo.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Emulsiones gruesas de okara

4.3.1.1 Distribución de tamaño de partícula y microestructura de emulsiones

En esta sección se analizó la distribución del tamaño de partícula y la microestructura de las emulsiones gruesas para las tres fracciones de okara (OK, S-OK y OK-S). Las **Figuras 4.1** y **4.2** presentannlas diferentes distribuciones de tamaño de partículas en volumen con sus respectivas micrografías.

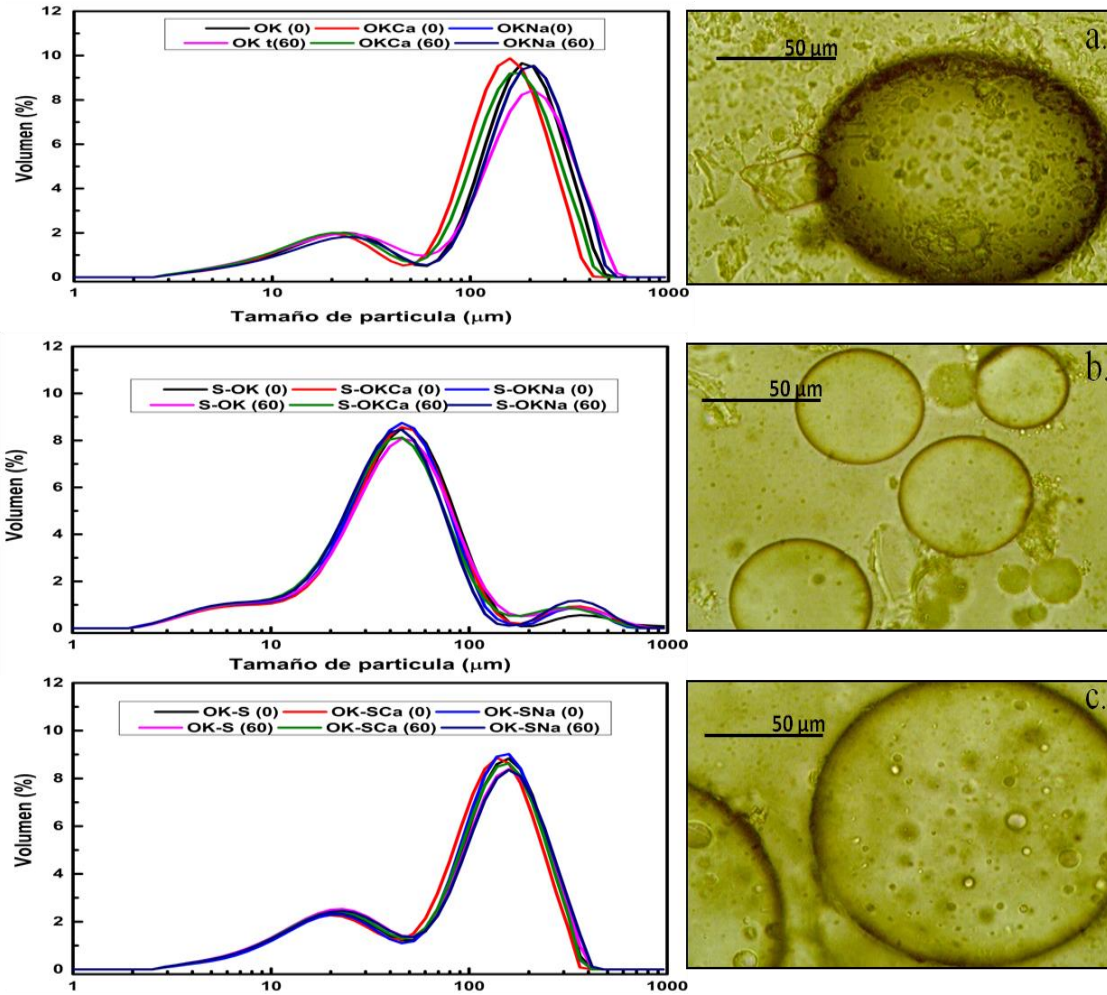


Figura 4.1. Distribuciones de tamaño de partícula y microestructura de emulsiones gruesas O/W preparadas con dispersiones acuosas (4,0% m/m) fracciones de okara a pH 3,0: a) OK, b) S-OK, c) OK-S, con y sin el agregado de sales (CaCl_2 o NaCl , 20mM).

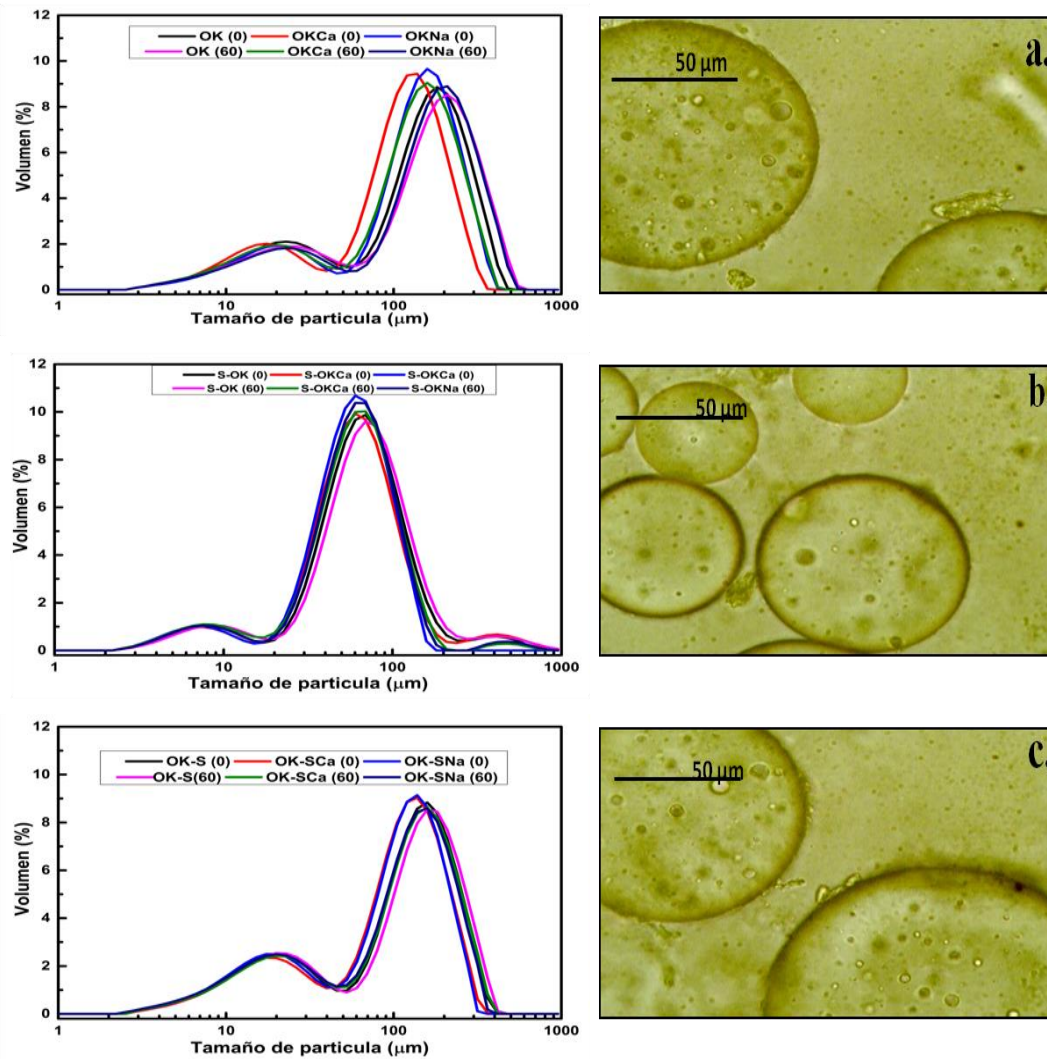


Figura 4.2. Distribuciones de tamaño de partícula y microestructura de emulsiones gruesas O/W preparadas con dispersiones acuosas (4,0% m/m) fracciones de okara a pH 4,5: a) OK, b) S-OK, c) OK-S, con y sin el agregado de sales (CaCl_2 o NaCl , 20mM).

En todas las fracciones de okara a una concentración de 4% m/m se observó una distribución multimodal, con un diámetro promedio de De Brouckere ($D[4,3]$) de aproximadamente 147 μm para la fracción OK, 58 μm para S-OK y 113 μm para OK-S a

pH 3,0 (**Tabla 4.1**) y de 137 μ m, 75 μ m y 115 μ m, respectivamente, a pH 4,5 (**Tabla 4.2**). Estos valores corresponden a emulsiones sin el agregado de sales. Como puede observarse, las emulsiones con S-OK presentaron, en todas las condiciones evaluadas, los menores valores de D[4,3], respecto a las otras fracciones de okara. Se aclara que en las emulsiones formuladas al 2% m/m, se evidenció un aumento significativo de los diámetros promedio de partícula para ambos pH estudiados, resultando en emulsiones altamente inestables frente a la coalescencia con un diámetro promedio inicial mayor a 200 μ m (resultados no mostrados).

Tabla 4.1. Diámetros promedios de De Brouckere D[4,3] obtenidos a partir de las distribuciones de tamaño de partícula de emulsiones gruesas O/W 4% m/m a pH 3,0.

Tiempo (min)	1	30	60
OK	147,2 \pm 3,4 _c	163,8 \pm 2,3 _c	155,7 \pm 5,8 _c
OK_{Ca}	147,75 \pm 1,2 _c	158,5 \pm 1,1 _c	150,2 \pm 1,2 _c
OK_{Na}	149,4 \pm 2,2 _c	161,3 \pm 1,2 _c	154,9 \pm 0,6 _c
S-OK	57,9 \pm 2,5 _a	53,5 \pm 4,7 _a	57,0 \pm 2,4 _a
S-OK_{Ca}	57,5 \pm 3,3 _a	48,5 \pm 1,3 _a	54,4 \pm 1,4 _a
S-OK_{Na}	53,0 \pm 3,2 _a	52,0 \pm 0,1 _a	53,5 \pm 2,2 _a
OK-S	112,7 \pm 0,7 _b	115,8 \pm 2,6 _b	115,9 \pm 0,9 _b
OK-S_{Ca}	108,2,3 \pm 1,9 _b	109,1 \pm 2,0 _b	112,2 \pm 1,3 _b
OK-S_{Na}	111,8 \pm 1,3 _b	114,8 \pm 1,8 _b	117,3 \pm 1,8 _b

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

Tabla 4.2. Diámetros promedios de De Brouckere $D[4,3]$ obtenidos a partir de las distribuciones de tamaño de partícula de emulsiones gruesas O/W 4% m/ma pH 4,5.

Tiempo (min)	1	30	60
OK	137,2±3,2 _g	149,4±5,2 _f	157,8±8,2 _e
OK _{Ca}	105,1±0,5 _d	128,8±2,4 _e	124,6±1,8 _d
OK _{Na}	127,5±0,4 _f	152,4±2,1 _f	157,3±1,9 _e
S-OK	75,3±0,7 _b	75,8±0,2 _b	82,3±2,3 _b
S-OK _{Ca}	74,0±0,3 _b	75,5±1,1 _b	76,5±1,2 _b
S-OK _{Na}	59,6±0,6 _a	61,6±1,4 _a	65,6±2,4 _a
OK-S	114,6±4,0 _e	120,8±3,6 _{d,e}	127,9±1,6 _d
OK-S _{Ca}	103,0±0,5 _{c,d}	112,2±0,4 _c	117,1±1,5 _c
OK-S _{Na}	98,0±0,7 _c	112,9±1,6 _{c,d}	114,6±0,1 _c

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

Durante 60 minutos, tiempo máximo de almacenamiento, el aumento del tamaño de las gotas fue $< 5\%$ a pH 3,0 y $< 23\%$ a pH 4,5, en comparación con el tamaño inicial en todas las condiciones de estudio. Teniendo en cuenta que se trata de un proceso de homogeneización primario (emulsiones gruesas), este resultado puede considerarse promisorio en relación a la actividad de las muestras frente al proceso de coalescencia. Particularmente, considerando ambas condiciones de pH, la muestra S-OK presentó tamaños de partícula iniciales menores a $80\mu\text{m}$, fue la que tuvo un menor aumento del

tamaño de gotas durante el tiempo de análisis. Esta diferencia con las demás muestras de okara (OK y OK-S) también se evidenció durante el análisis microscópico de las emulsiones (**Figuras 4.1 y 4.2**) (Moscoso Ospina., et al 2022). Adicionalmente, se resalta que no se evidenció una desestabilización drástica en las distribuciones de tamaño de las gotas por la adición de sales de sodio y de calcio a ambos pH estudiados. Incluso, en algunos casos, la adición de sales generó menores tamaños de gota con respecto a su variable sin el agregado de sal. A partir de estos resultados, podría plantearse la inclusión de dichas sales en la fortificación de emulsiones O/W con fracciones de okara de soja, resultando una perspectiva de estudio para las emulsiones finas.

El aumento del tamaño de las gotas en las emulsiones formuladas con la fracción S-OK a pH 4,5 (**Tabla 4.2**) con respecto a pH 3,0, podría estar directamente influenciado por la neutralización de la carga de las proteínas, considerando que estamos trabajando a un pH cercano al pI de las proteínas de reserva de la soja. En esta condición, se presenta la menor solubilidad de las proteínas (**Figura 3.4**) resultando afectadas sus propiedades emulsificantes (Molina y Wagner, 2002; Wagner y Guéguen 1999).

4.3.1.2 Análisis de la estabilidad frente al proceso de cremado

La estabilidad de las emulsiones gruesas formuladas con las tres fracciones de okara se analizó en tubos graduados durante una hora de almacenamiento a pH 3,0 y 4,5, estas se muestran en la **Figura 4.3**. Como se mencionaba anteriormente, el efecto de la concentración de okara en emulsiones O/W es muy importante en la estabilidad de las

emulsiones. Una mayor concentración permitiría una disminución de la velocidad de separación de la fase acuosa. Las emulsiones al 2% m/m presentaron una separación máxima de fase acuosa del 40% a pH 3,0 y del 45% a pH 4,5. En cambio un aumento de concentración a 4 % m/m, mostró una separación máxima del 25% a pH 3,0 y 35% a pH 4,5.

Al igual que en el análisis previo sobre tamaño de partícula (**Sección 4.3.1.1**), se evidenció un efecto importante de la variable pH sobre el comportamiento de las emulsiones formuladas con S-OK. En este sentido, S-OK con la adición de NaCl y CaCl₂ a pH 3,0, presentó la menor la desestabilización gravitacional (FA %= 0%), a diferencia de la variante sin el agregado de sales (FA %= 15%) como se puede ver en la **Figura 4.3_b**. La interacción de las sales de calcio y sodio con S-OK, podrían tener un efecto importante en la estabilidad de las emulsiones retrasando la velocidad en el cremado. Una concentración baja de sal podría aumentar la solubilidad de las proteínas. El proceso de solubilización por sales se puede describir como la unión adicional de la sal al dominio hidrofílico de las proteínas, permitiendo su resolubilización al aumentar la carga de las mismas, lo que ocasiona una repulsión electrostática proteína-proteína (Vieira et al., 2006). Por otro lado, a pH 3,0, OK y OK-S presentaron valores de separación de fase acuosa entre 15 y 25% (**Figura 4.3_{a,c}**).

En las emulsiones a pH 4,5, se observó una mayor velocidad de desestabilización desde el minuto 15 en todas las fracciones de okara (**Figura 4.3_{a,e,f}**). S-OK fue la fracción más afectada con una separación de la fase acuosa del 35%. Esto quiere decir que el

aumento del cremado en esta fracción podría estar condicionado por la agregación de las proteínas a pH isoelectrico, con menores repulsiones electrostáticas, propiciando la generación de agregados de gotas en estructuras tipo flóculos que aceleran el cremado. Por otro lado, OK-S presentó el menor porcentaje de separación (15%). Se resalta que a este pH, las sales no disminuyeron la velocidad de desestabilización en forma importante con respecto a las emulsiones formuladas sin presencia de las mismas (**Figura 4.3_{d,e,f}**). Por otro lado, en las correspondientes micrografías (**Figura 4.2**) no se pudieron evidenciar la presencia de flóculos, pero estos pudieron ser disociados al momento de hacer la dilución.

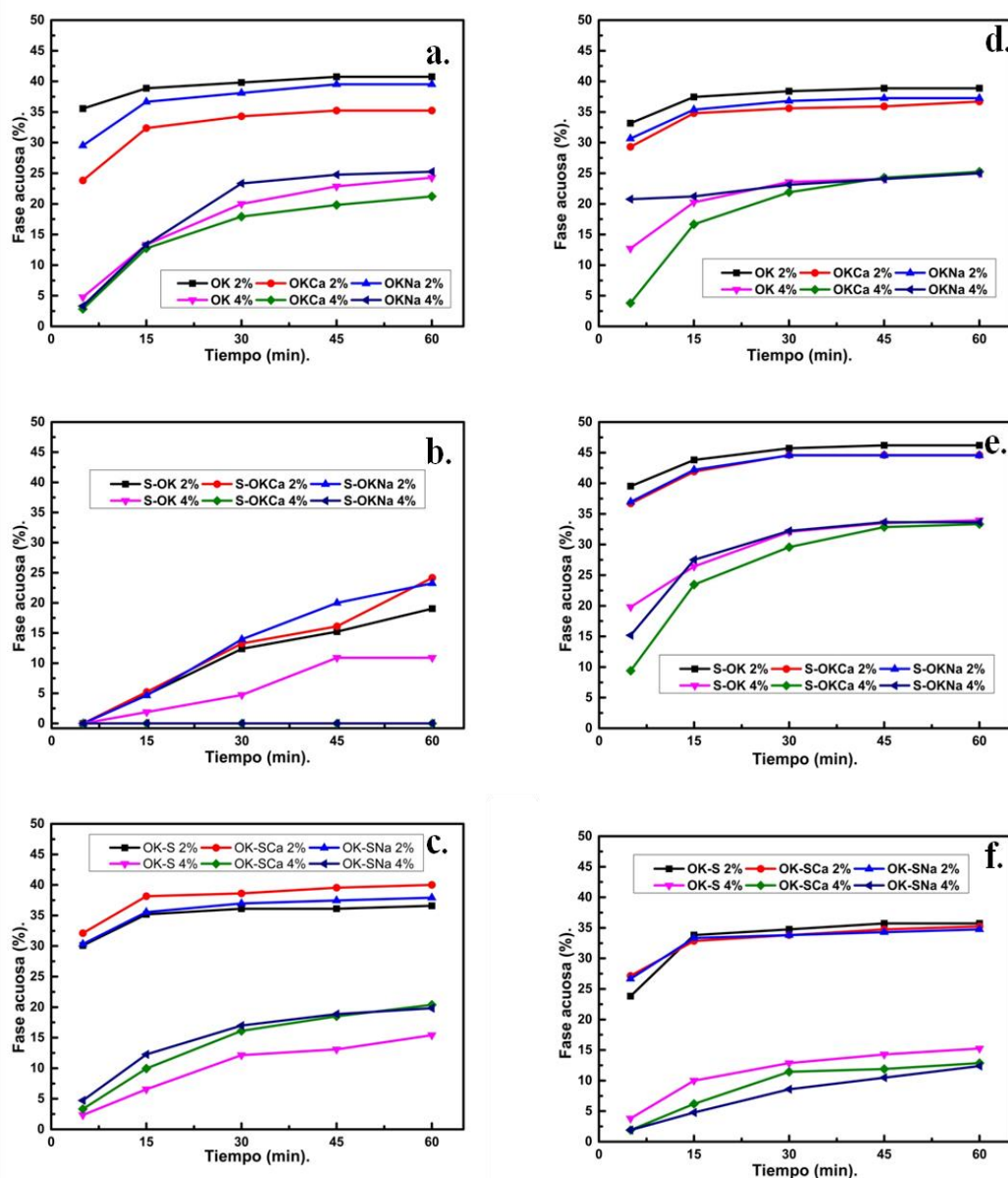


Figura 4.3. Cinética de cremado (FA%) en el tiempo, con y sin el agregado de sales (NaCl y CaCl₂, 20mM) para muestras de okara (2 y 4% m/m), a) OK, b) S-OK, c) OK-S a pH 3,0 y d) OK, e) S-OK, f) OK-S a pH 4,5. Valores medios (n = 3).

4.3.2' Emulsiones finas de S-OK

4.3.2.1 Distribución de tamaño de partícula y microestructura de emulsiones

Se desarrollaron emulsiones finas con la fracción de okara que mostró las mejores propiedades en el desarrollo de emulsiones gruesas, es decir, se continuó trabajando con la fracción S-OK (4% m/m). A pH 3,0, estas emulsiones exhibieron valores iniciales de $D[4,3]$ entre 10,7 y 12,2 μm (**Tabla 4.3**). En cambio, a pH 4,5, todas las emulsiones mostraron un tamaño de partícula inicial superior a 50 μm . Al igual que lo analizado en las emulsiones gruesas, las condiciones de pH cercanos al pI, modifican claramente el comportamiento interfacial de las proteínas, afectando su capacidad emulsificante y aumentando el tamaño de partícula inicial (McClements. 1999). Se debe tener en cuenta que en estas emulsiones, no fue posible determinar el grado de floculación mediante la utilización de sonicación de baja energía debido a que esta genera desestabilización por coalescencia a ambos pH.

El aumento porcentual de tamaños de partícula durante el almacenamiento fue del 68,2% a pH 3,0 y del 6,5% a pH 4,5, para la emulsión sin el agregado de sales en ambas condiciones de estudio. Sin embargo, haciendo una relación entre los tamaños de partícula (**Tabla 4.3**) y las micrografías de los diferentes sistemas (**Figura 4.4**) se puede observar que los diámetros analizados estarían asociados a la presencia de estructuras tipo flóculos y no al de partículas individuales. Por ello, este aumento en los valores de $D[4,3]$ no podría atribuirse solamente a un proceso de coalescencia.

El agregado de sales generó un comportamiento diferencial respecto del pH al que fueron formuladas las emulsiones. A pH 3,0, el agregado de sales no modificó significativamente el tamaño de partícula inicial, sin embargo, esta adición generó una mayor estabilidad del tamaño de partícula en el tiempo. Por otro lado, en condiciones de pH 4,5, la adición de sales permitió disminuir el tamaño de partícula inicial. Probablemente, esto se puede deber a la formación de interacciones por puentes de sal creando estructuras que mantendrían los flóculos en una estructura más compacta. Sin embargo, las emulsiones con dichas sales presentaron un incremento superior del tamaño de partícula a lo largo del almacenamiento, de 19,0% y 24,6% con agregado de calcio y de sodio, respectivamente. Esto puede deberse a un proceso de coalescencia o a un proceso de formación de flóculos de mayor tamaño.

Tabla 4.3. Diámetros promedios de De Brouckere $D[4,3]$ obtenidos a partir de las distribuciones de tamaño de partícula de emulsiones finas O/W 4% m/m.

Tiempo (días)	pH 3,0			pH 4,5		
	D[4,3]					
	1	14	28	1	14	28
S-OK	10,7±0,6 _a	13,9±1,4 _a	18,0±0,4 _b	61,7±2,7 _b	64,7±0,2 _b	65,7±0,8 _b
S-OK_{Ca}	12,2±0,2 _a	12,7±0,5 _a	14,8±0,6 _a	51,6±2,7 _a	56,5±2,1 _a	61,5±1,0 _a
S-OK_{Na}	11,0±0,1 _a	12,7±0,5 _a	13,9±0,1 _a	52,0±3,6 _a	64,2±0,8 _b	64,8±0,2 _b

Nota. Los valores se expresaron como el promedio de tres mediciones independientes ($n = 3$) \pm desvío estándar. Los valores promedio en una misma columna (emulsiones medidas al mismo

tiempo, expresado en días) seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo determinado por la prueba de Fisher.

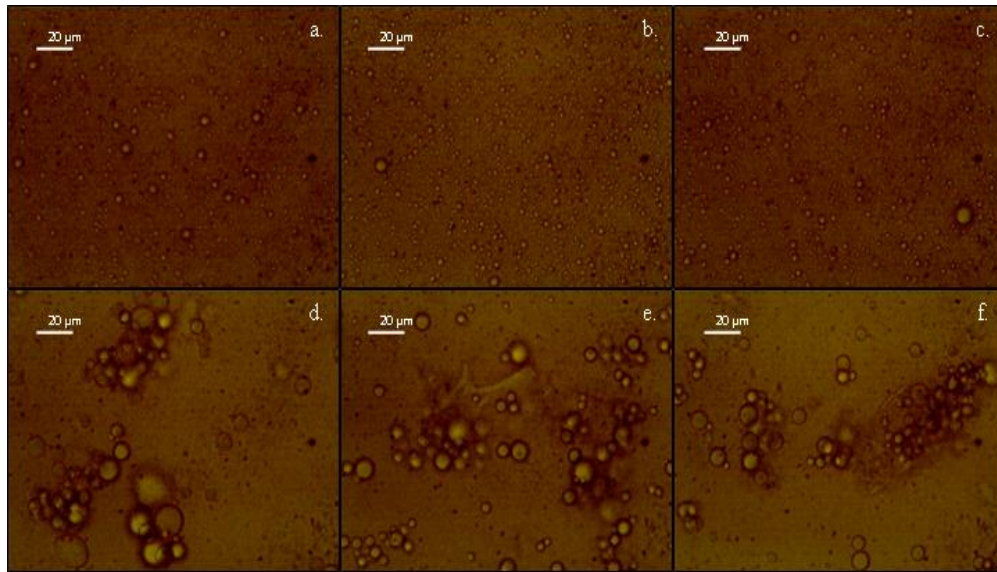


Figura 4.4. Micrografía de emulsiones finas O/W mostradas en el día 28 (aumento: 40X, dilución 1:3V/V) con y sin el agregado de sales (CaCl_2 o NaCl , 20mM), para fracción S-OK (4,0% m/m): a) S-OK, b) S-OK_{Ca}, c) S-OK_{Na} a pH 3,0 y d) S-OK, e) S-OK_{Ca}, f) S-OK_{Na} a pH 4,5.

4.3.2.2 Estabilidad global de las emulsiones de S-OK

La estabilidad global para emulsiones de S-OK se analizó mediante el análisis de los perfiles de retrodispersión (BS%) en función de la longitud del tubo de medición (mm). También, se determinaron los valores del parámetro TSI como índice de estabilidad global. Se realizaron medidas puntuales semanales hasta un tiempo final de almacenamiento de 28 días. La evolución de los perfiles de BS de las emulsiones O/W de

S-OK, con y sin el agregado de sales, se muestran en la **Figura 4.5**. El valor de BS% es inversamente proporcional al tamaño de las gotas (Wang et al., 2018), es decir, la generación de gotas más pequeñas, permite obtener un BS% inicial mayor. En este sentido, a pH 3,0 todas las emulsiones presentaron una elevada estabilidad con un BS inicial del 90% y una separación de fase acuosa final menor al 12% de la fase acuosa (gráficos no mostrados). El TSI (*Turbiscan Stability Index*) es el parámetro utilizado para caracterizar la estabilidad física de las emulsiones. Las emulsiones son termodinámicamente inestables y en un tiempo determinado se produce una separación de fases. Esta separación puede ocurrir en poco tiempo o en varios días y el equipo utilizado permite detectar esta desestabilización en forma más eficiente (Formulation, 2020). Por otro lado, a pH 4,5 se observó un valor de BS% cercano al 80%, en las tres condiciones de análisis, siendo inferiores a los analizados previamente a pH 3,0. Este comportamiento se relaciona directamente con la presencia de partículas de mayor tamaño generadas a un valor de pH cercano al isoelectrico. A este pH, se evidenció una separación de fase acuosa cercana al 15% en las diferentes condiciones (resultados no mostrados).

Con respecto a la estabilidad general de las diferentes emulsiones, se resalta que en todos los casos estos sistemas presentaron bajos valores de TSI (< 10,49%) (**Figura 4.5**), con una estabilidad mayor con el agregado de sales. Estas sales se encontrarían mejorando la interacción entre proteínas y polisacáridos a nivel interfacial.

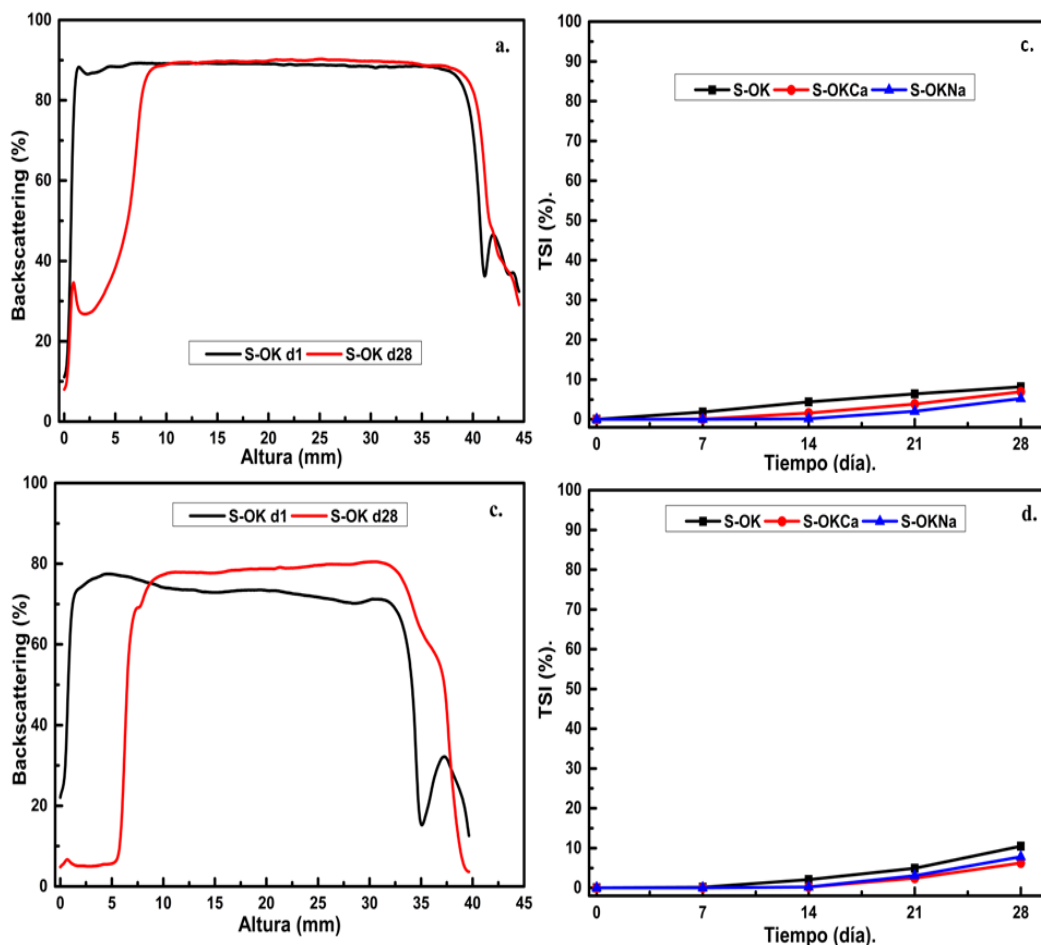


Figura 4.5. Perfiles de Backscattering (BS% vs. longitud del tubo mm) y el índice de estabilidad de Turbiscan (TSI vs. tiempo en días) en emulsiones finas O/W de fracción S-OK (4,0% m/m): a) Perfil BS% sin sal, b) TSI, a pH 3,0 y c) Perfil BS% sin sal, d) TSI, a pH 4,5. Valores medios (n = 3).

4.3.2.3 Reología oscilatoria de S-OK

El módulo complejo G^* (Pa) se analizó en función de la frecuencia de oscilación (0,6-628Rad/s, deformación 1%) dentro del rango de viscoelasticidad lineal. Los

reogramas se analizaron a un tiempo inicial y luego de 28 días a pH 3,0 y 4,5. Dichas gráficas, se muestran en la **Figura 4.6** para emulsiones de S-OK (4% m/m).

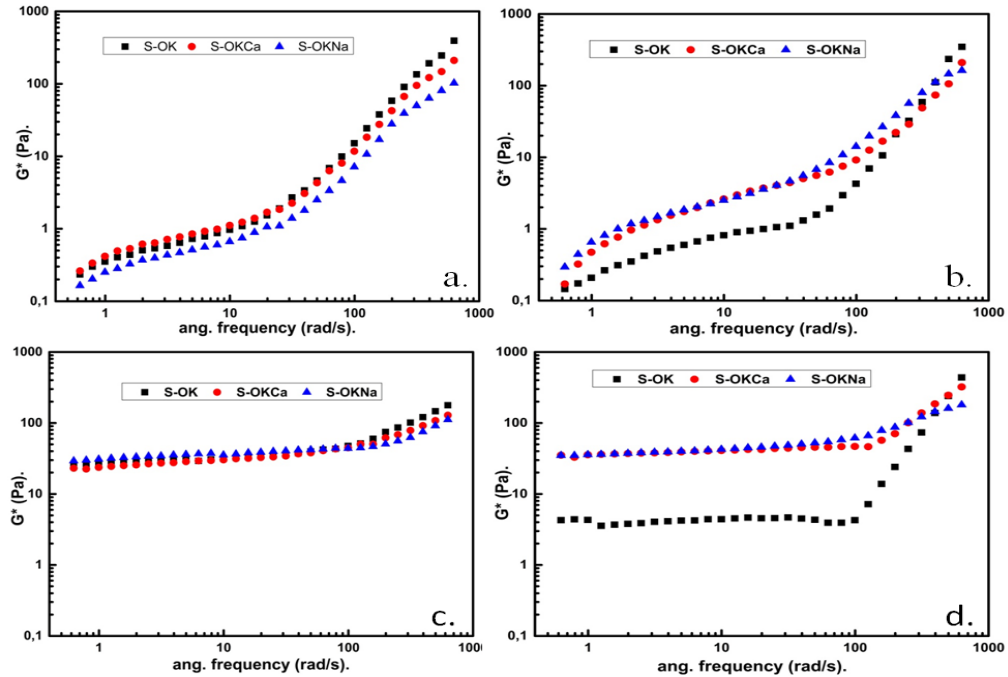


Figura 4.6. Reogramas (G^* vs frecuencia Rad/s) en emulsiones finas O/W de fracciones S-OK (4,0% m/m): a) día 1, b) día 28 a pH 3,0 y c) día 1, d) día 28 a pH 4,5. Valores medios ($n = 3$).

En todas las condiciones, las emulsiones formuladas con S-OK dependen de la frecuencia. Particularmente, el módulo complejo fue creciendo con el aumento de la frecuencia. Debemos tener en cuenta que el módulo de corte complejo es una medida de resistencia total a la deformación, en este caso por la frecuencia. Este se utiliza para caracterizar el comportamiento tanto viscoso como elástico. En todos los reogramas el módulo G' es superior al G'' (datos no mostrados). En general, las funciones viscoelásticas dinámicas, aumentan con el pH de la emulsión en todo el intervalo de

frecuencia. La adición de S-OK hace que predomine el módulo elástico. Esto quiere decir que G' es directamente proporcional a la energía almacenada por el material en un ciclo de deformación. A ambos pH, no hubo a tiempo inicial, diferencias significativas entre las muestras con y sin el agregado de sales. A pH 3,0, se observó una desestabilización global de la estructura a tiempo final de almacenamiento (28 días) solamente en la muestra sin el agregado de sales. Este comportamiento fue similar a pH 4,5, donde el G^* fue superior en casi todo el rango de frecuencia respecto a las emulsiones a pH 3,0. La adición de sales promovería una mayor rigidez en la estructura de estas emulsiones impidiendo una desestabilización acelerada. Esta rigidez podría relacionarse a la mencionada presencia de flóculos en todos los sistemas, presentando una estructura más rígida en las emulsiones formuladas en valores cercanos al pH isoeléctrico, con la presencia de una fase continua de mayor viscosidad.

4.3.3' Emulsiones finas de fracciones ISPS

4.3.3.1 Distribución de tamaño de partícula y microestructura de emulsiones de ISPS

Las DTP de las emulsiones formuladas con fracciones ISPS 2% m/m a pH 3,0 y 4,5 se muestran en la **Figura 4.7**. Dicha concentración se seleccionó según trabajos previos realizados en nuestro laboratorio de investigación (Porfiri et al., 2016). Los valores $D[4,3]$ promedio se muestran en la **Tabla 4.4**. Todas las emulsiones presentaron valores constantes en sus tamaños de partícula, demostrando estabilidad frente al proceso

de coalescencia. S-ISPS, fue la fracción que tuvo tamaños de partícula más pequeños, presentando diámetros, con y sin el agregado de sales, entre 10,7-11,6 m a pH 3,0 y 15,6-18,1 m a pH 4,5. A diferencia de la fracción de okara, las fracciones ISPS no se vieron afectadas en forma importante por la influencia del pH, esto quiere decir que las proteínas presentes en estas fracciones además de estabilizar el tamaño de gota en el tiempo, no se ven afectadas en condiciones de pH cercanas a las del punto isoeléctrico. Se puede observar la reducción del tamaño de partícula de las emulsiones, particularmente en condiciones de pH 4,5, donde las muestras de okara presentaron tamaños iniciales en el rango entre 51 y 62 m. Este resultado podría relacionarse directamente con el aumento de la solubilidad proteica y la participación de las estructuras de los polisacáridos en la estabilidad del film interfacial. Por otro lado, se resalta que, al igual que lo analizado para las muestras de okara, la fracción S-ISPS derivada del proceso con sonicación previa extracción alcalina presentó los menores tamaños de partícula. Por último, la adición de sales no generó diferencias significativas dentro de cada fracción tanto a pH 3,0 como a pH 4,5, para todos los tiempos estudiados.

Formulación y estabilización de emulsiones O/W

Tabla 4.4. Diámetros promedios de De Brouckere $D[4,3]$ obtenidos a partir de las distribuciones de tamaño de partícula de emulsiones finas O/W 2% m/m pH 3,0 y 4,5.

Tiempo (días)	pH 3,0			pH 4,5		
	1	14	28	1	14	28
	D[4,3]					
ISPS	28,3±0,0 _c	28,4±0,4 _c	28,8±1,5 _c	28,8±2,5 _c	29,8±0,5 _c	29,1±2,6 _c
ISPS_{Ca}	28,0±0,3 _c	27,6±0,5 _c	28,4±0,1 _c	28,3±3,2 _c	29,9±3,8 _c	29,8±1,5 _c
ISPS_{Na}	27,3±3,7 _c	27,5±0,1 _c	27,1±1,6 _c	27,7±0,4 _c	29,9±0,5 _c	31,1±2,4 _c
S-ISPS	11,7±0,2 _a	11,4±0,5 _a	10,6±0,6 _a	17,9±0,4 _b	17,4±2,2 _b	18,1±0,1 _b
S-ISPS_{Ca}	11,0±2,7 _a	11,4±0,3 _a	9,9±2,6 _a	16,7±0,3 _a	17,2±1,1 _b	16,3±0,9 _a
S-ISPS_{Na}	11,5±1,6 _a	11,1±0,1 _a	11,4±0,8 _a	15,6±0,7 _a	14,6±0,2 _a	15,3±0,7 _a
ISPS-S	24,3±0,1 _b	24,7±2,2 _b	24,9±0,5 _b	29,2±7,4 _c	30,2±1,7 _c	29,3±0,3 _c
ISPS-S_{Ca}	23,4±0,2 _b	23,9±0,2 _b	24,6±1,5 _b	29,1±4,5 _c	29,7±2,0 _c	29,9±2,1 _c
ISPS-S_{Na}	23,5±0,3 _b	23,8±0,2 _b	24,9±0,4 _b	28,5±2,0 _c	27,5±0,2 _c	29,3±2,1 _c

Nota. Los valores se expresaron como el promedio de tres mediciones independientes ($n = 3$) ± desvío estándar. Los valores promedio en una misma columna (emulsiones medidas al mismo tiempo (min) seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$),

Los polisacáridos insolubles de soja probablemente generarían películas interfaciales con propiedades viscoelásticas, aumentando la viscosidad en la interfase y protegiendo las gotas (Ngouémazong et al., 2015). Estos valores podrían estar relacionados con la presencia de una matriz glicoproteica, cuya actividad pudo haberse activado por los cambios a nivel estructural generados durante el proceso de extracción ácida a elevados valores de temperatura y presión. En este sentido, la actividad de las proteínas y los polisacáridos, estaría ligada a una interacción conjunta actuando como un agente emulsificante-estabilizante. Esto explicaría la diferencia entre okara e ISPS, en

términos de la resistencia interfacial determinada por el análisis reológico del film (sección 3.3.4).

El grado de floculación para emulsiones con ISPS se muestra en la **Tabla 4.5**. Las emulsiones formuladas con fracciones ISPS presentaron grados de floculación mayores al 40%, la presencia de estos flóculos se relacionaría directamente con la estabilidad de emulsiones ISPS y la mencionada actividad emulsificante/estabilizante. Adicionalmente, la presencia de estas estructuras floculadas se confirmó mediante microscopía óptica (**Figura 4.8**).

Tabla 4.5. Grado de floculación obtenidos a partir de las distribuciones de tamaño de partícula de emulsiones finas O/W 2% m/m a pH 3,0 y 4,5.

Tiempo (días)	pH 3,0			pH 4,5		
	1	14	28	1	14	28
	GF %					
ISPS	186,8±24,6 _d	130±0,5 _f	134,2±5,1 _e	64,3±2,1 _b	77,0±1,2 _b	62,4±9,2 _{b,c}
ISPS_{Ca}	117,8±0,36 _b	105,7±4,7 _d	117,3±0,9 _c	91,8±3,5 _e	74,1±3,0 _b	58,5±6,5 _{b,c}
ISPS_{Na}	121,8±1,3 _c	116,7±5,8 _e	127,4±5,3 _d	54,8±9,9 _a	83,1±4,9 _b	66,6±5,0 _c
S-ISPS	40,5±0,5 _a	33,9±1,6 _a	77,9±8,4 _b	121,6±7,6 _{f,g}	112,6±10,6 _c	114,8±8,7 _d
S-ISPS_{Ca}	127,7±3,8 _c	138,7±5,4 _g	155,6±2,7 _b	116,7±6,9 _f	113,8±4,5 _c	120,6±12,2 _d
S-ISPS_{Na}	114,1±2,1 _b	67,6±4,8 _c	126,7±5,1 _d	127,7±7,5 _g	126,7±5,6 _d	136,8±5,3 _e
ISPS-S	45,2±0,1 _a	47,1±1,1 _b	51,7±4,0 _a	82,9±3,6 _d	39,9±1,6 _{a,b}	43,3±1,1 _a
ISPS-S_{Ca}	44,7±6,8 _a	50,9±1,2 _b	53,2±5,7 _a	73,3±2,6 _c	43,4±1,0 _b	53,2±3,5 _b
ISPS-S_{Na}	40,7±3,2 _a	44,3±1,2 _b	50,2±2,1 _a	57,6±1,8 _a	32,4±2,1 _a	55,0±1,7 _b

Nota. Los valores se expresaron como el promedio de tres mediciones independientes (n = 3) ± desvío estándar. Los valores promedio en una misma columna (emulsiones medidas al mismo tiempo) seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes (p <0,05),

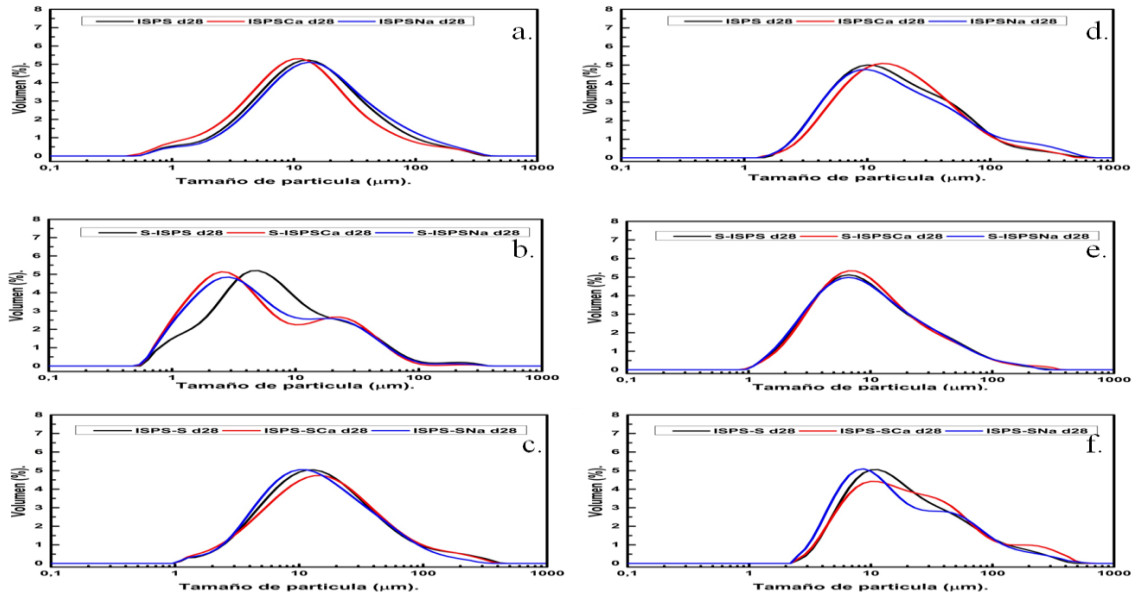


Figura 4.7. Distribuciones de tamaño de partícula de emulsiones finas O/W preparadas con dispersiones acuosas (2,0% m/m) de fracciones de polisacáridos insolubles de soja, con y sin el agregado de sales (CaCl₂ o NaCl, 20mM): a) ISPS, b) S-ISPS c) ISPS-S a pH 3,0 y d) ISPS, e) S-ISPS, f) ISPS-S a pH 4,5. Valores medios (n = 3).

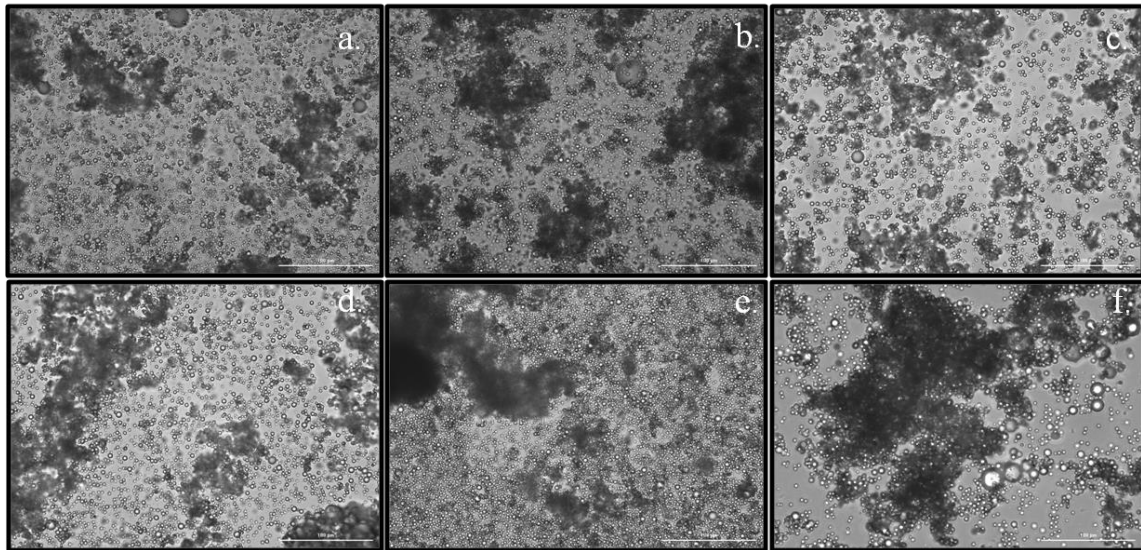


Figura 4.8. Micrografía de emulsiones finas O/W en el día 28 (aumento: 100X, dilución 1:10V/V) con o sin el agregado de sales (CaCl_2 o NaCl , 20mM), para fracciones de polisacáridos insolubles de soja (2,0% m/m): a) ISPS, b) S-ISPS, c) ISPS-S a pH 3,0 y d) ISPS, e) S-ISPS, f) ISPS-S a pH 4,5.

4.3.3.2 Estabilidad global de las emulsiones ISPS

Los perfiles de retrodispersión (BS%) para las emulsiones formuladas con fracciones de ISPS se muestran en la **Figura 4.9** y los valores del índice de estabilidad del Turbiscan (TSI) en la **Tabla 4.6**. Estos perfiles se realizaron en función de la longitud del tubo de medición (mm) en medidas semanales hasta un tiempo final de 28 días de almacenamiento. ISPS y ISPS-S tienen valores de BS% de 80% y S-ISPS de casi 90%. Esta diferencia se relaciona con la presencia de gotas de menor tamaño en las emulsiones formuladas con la fracción sonicada previa extracción alcalina. La estabilidad frente a los diferentes procesos de desestabilización de las emulsiones ISPS mejoró

significativamente respecto a las analizadas previamente con la fracción S-OK. Esto puede relacionarse a la mejora en las características reológicas del film interfacial y al aumento de la presión en la interface (**Figura 3.9 y 3.7**). La floculación tendría una incidencia significativa sobre esta estabilidad, aumentando la viscosidad de la fase continua por la acumulación de gotas, impidiendo el movimiento de las gotas de aceite en la emulsión y por lo tanto, evitando un proceso de coalescencia durante el periodo de almacenamiento. Finalmente, se resalta que las condiciones de pH y el agregado de sales no generaron un efecto significativo sobre la estabilidad de estos sistemas.

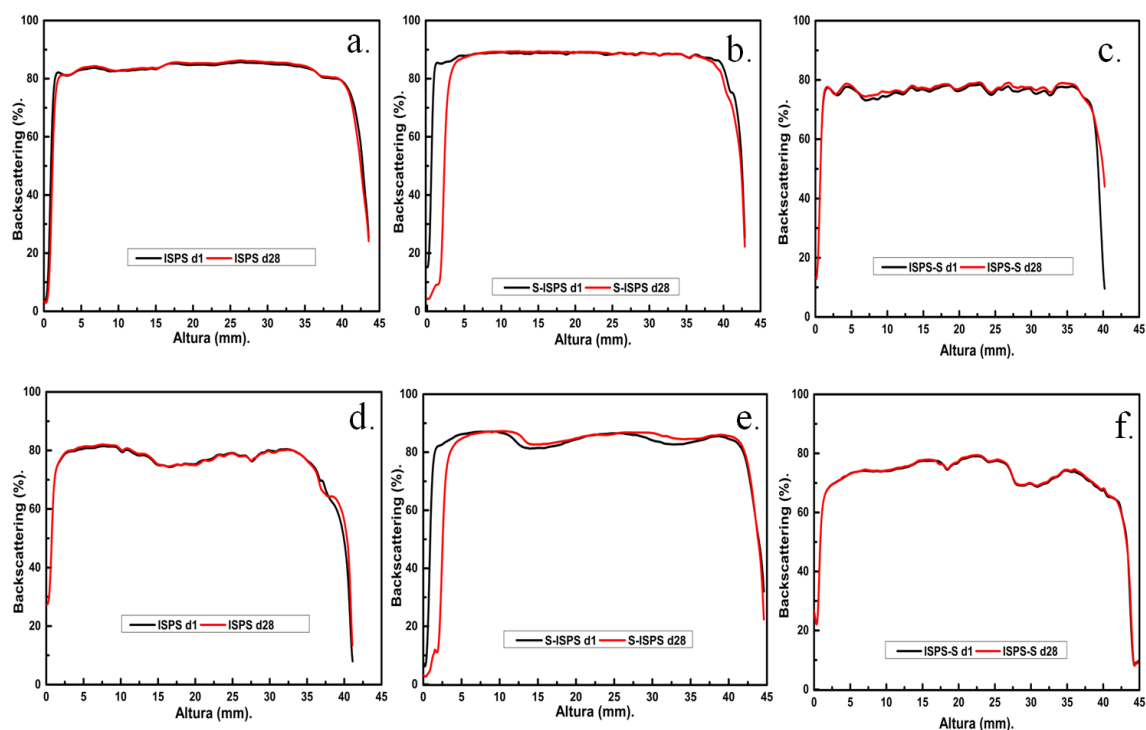


Figura 4.9. Perfiles de Backscattering (BS% vs. longitud del tubo mm) en emulsiones finas O/W de fracciones ISPS (2,0% m/m): a) ISPS, b) S-ISPS, c) ISPS-S Perfiles BS a pH 3,0 y d) ISPS, e) S-ISPS, f) ISPS-S a pH 4,5. Valores medios ($n = 3$).

Tabla 4.6. Índice de estabilidad de Turbiscan obtenidos a partir de emulsiones finas O/W formuladas con fracciones ISPS (2% m/m) a pH 3,0 y 4,5.

Muestra	pH 3,0			pH 4,5		
	Tiempo (días)					
	1	14	28	1	14	28
ISPS	0±0 _a	0,3±0,2 _a	1,5±0,7 _a	0±0 _a	0,3±0,2 _a	2,4±1,1 _b
ISPS_{Ca}	0±0 _a	0,4±0,1 _a	1,5±0,1 _a	0±0 _a	0,1±0,0 _a	1,0±0,1 _a
ISPS_{Na}	0±0 _a	0,4±0,2 _a	1,3±0,5 _a	0±0 _a	0,1±0,0 _a	1,0±0,1 _a
S-ISPS	0±0 _a	1,0±0,0 _b	4,9±0,4 _b	0±0 _a	0,8±0,1 _b	6,7±1,0 _c
S-ISPS_{Ca}	0±0 _a	1,8±0,4 _c	8,4±0,7 _d	0±0 _a	0,2±0,0 _a	1,4±0,0 _a
S-ISPS_{Na}	0±0 _a	2,1±0,8 _c	6,9±1,0 _c	0±0 _a	0,7±0,2 _b	5,6±1,1 _c
ISPS-S	0±0 _a	0,3±0,1 _a	1,9±0,5 _a	0±0 _a	0,2±0,1 _a	1,1±0,5 _a
ISPS-S_{Ca}	0±0 _a	0,2±0,0 _a	1,2±0,1 _a	0±0 _a	0,1±0,0 _a	0,9±0,2 _a
ISPS-S_{Na}	0±0 _a	0,2±0,1 _a	1,5±0,5 _a	0±0 _a	0,2±0,1 _a	1,4±0,4 _a

Nota. Los valores se expresaron como el promedio de tres mediciones independientes (n = 3) ± desvío estándar. Los valores promedio en una misma columna (emulsiones medidas al mismo tiempo (min) seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes (p <0,05), según lo determinado por la prueba de Fisher.

Los índices de estabilidad de Turbiscan (TSI) se muestran en la **Tabla 4.6**. Todas las emulsiones presentaron una elevada estabilidad, independiente del pH y del agregado de sales. Se resalta que las emulsiones presentaron una desestabilización menor al 6,7%. Esta alta estabilidad global podría atribuirse a la presencia de una fuerte red de partículas generando una alta viscosidad, que dificulta la migración de las gotas a la parte superior del tubo (Huck-Iriart et al., 2011). Estos resultados resaltan la importancia de las

propiedades de los polisacáridos insolubles de soja para la incorporación en la formulación de emulsiones alimenticias. También, la posibilidad de la inclusión de sales de sodio y calcio en formulaciones para el desarrollo de emulsiones ácidas.

4.3.3.3 Reología oscilatoria de emulsiones ISPS

El módulo complejo G^* (Pa) se analizó en función de la frecuencia de oscilación (0,6-628Rad/s, deformación 1%) dentro del rango de viscoelasticidad lineal. Los reogramas se analizaron a un tiempo final de 28 días a pH 3,0 y 4,5. Estos reogramas se muestran en la **Figura 4.10** para las diferentes fracciones de polisacáridos insolubles de soja (2% m/m).

Las emulsiones formuladas con ISPS e ISPS-S presentaron una mayor elasticidad con respecto a la fracción S-ISPS. Por otro lado, el agregado de sales no generó un efecto significativo a los esfuerzos aplicados a excepción de algunas de las emulsiones formuladas con la fracción S-ISPS. La mayor resistencia a la deformación de las fracciones ISPS e ISPS-S se relaciona directamente con el aumento de la viscosidad como se puede ver en la **Figura 4.11**, esta viscosidad se generaría no solo por la presencia de flóculos, algo que también ocurre en las emulsiones con S-ISPS, sino además por presentar gotas agregadas con una estructura más compacta.

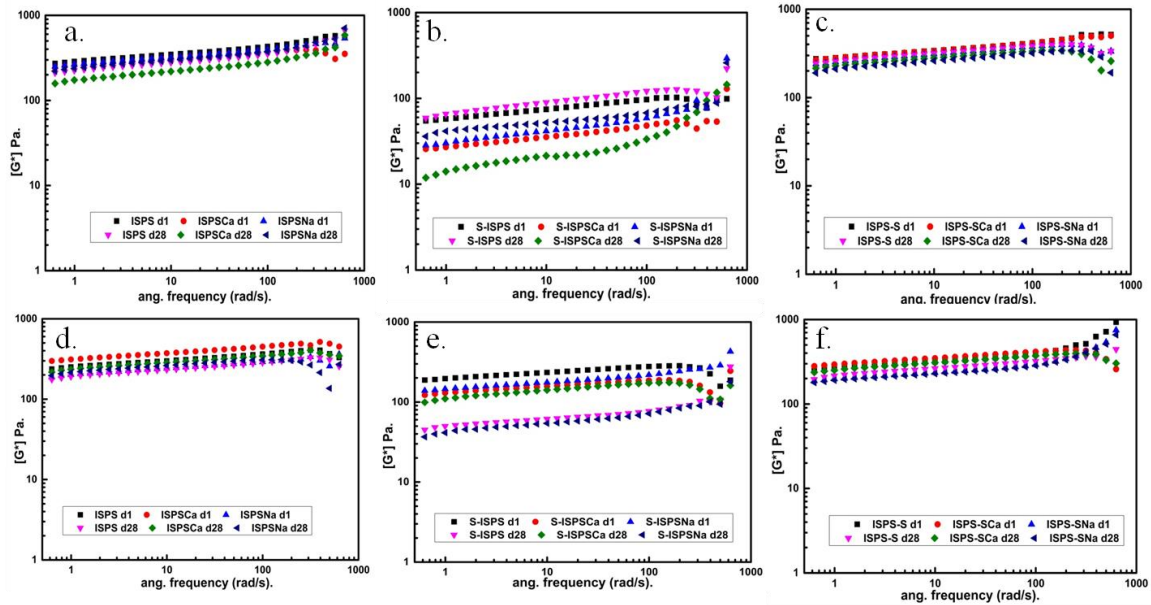


Figura 4.10. Reogramas G^* vs frecuencia Rad/s, en emulsiones finas O/W de fracciones ISPS (2,0% m/m): a) ISPS, b) S-ISPS, c) ISPS-S a pH 3,0 y d) ISPS, e) S-ISPS, f) ISPS-S a pH 4,5. Valores medios ($n = 3$).

4.3.3.4 Comportamiento de flujo de emulsiones S-OK e ISPS

La **Figura 4.11** muestra la viscosidad de las emulsiones vs shear rate. Todas las emulsiones mostraron un comportamiento pseudoplástico, disminuyendo su viscosidad al aumentar el shear rate, con un loop de histéresis que evidencia ruptura de estructuras durante el ciclo completo ensayado. Estas emulsiones aun estando floculadas no presentaron un aumento considerable del área ida/vuelta en cada ciclo.

Las emulsiones formuladas con polisacáridos insolubles de soja presentaron mayor viscosidad con respecto a S-OK a ambos pH. ISPS e ISPS-S con valores de viscosidad inicial superiores a 100Pa*s, independientemente de las condiciones de pH y

del agregado de sales. El comportamiento de las emulsiones frente a un aumento de los valores de shear rate, evidencia la presencia de los flóculos mencionados anteriormente, aumentando la viscosidad a valores entre 200 y 500Pa*s como efecto de una resistencia al proceso de deformación al que se sometió a los diversos sistemas.

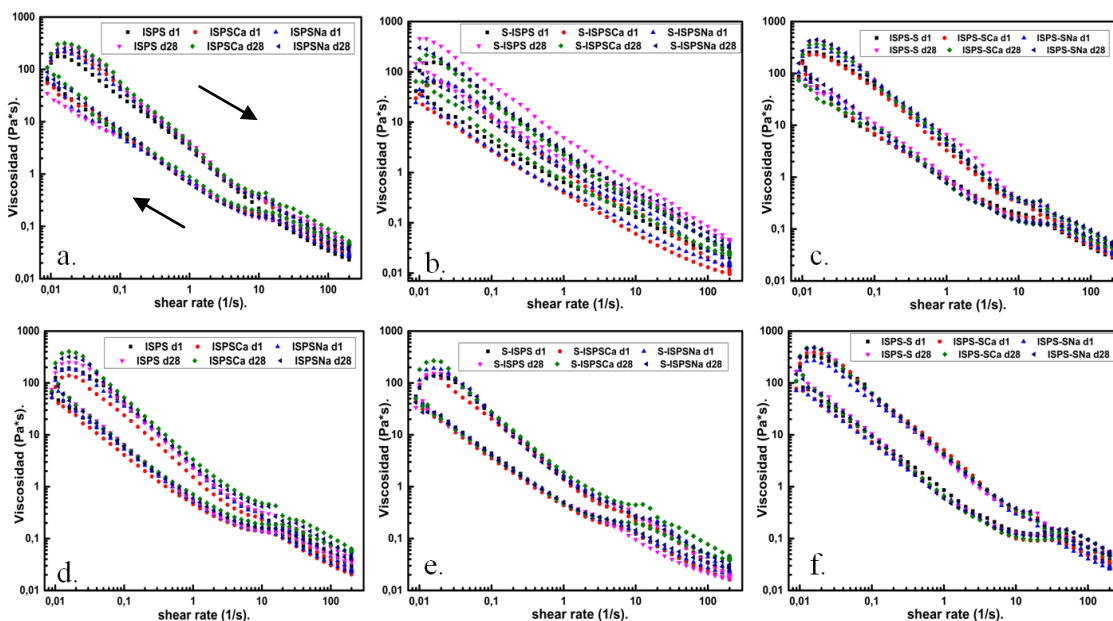


Figura 4.11. Reogramas de viscosidad vs shear rate, en emulsiones finas O/W de fracciones ISPS (2,0 % m/m): a) ISPS, b) S-ISPS, c) ISPS-S a pH 3,0 y d) ISPS, e) S-ISPS, f) ISPS-S a pH 4,5. Valores medios ($n = 3$).

Particularmente, las emulsiones formuladas con S-ISPS presentaron los menores valores iniciales de viscosidad. Esta fracción con un alto contenido de proteína, tiene una mayor capacidad de formación de área superficial y aunque permite la formación de flóculos, los mismos no serían tan compactos o resistentes como los generados con las otras fracciones de ISPS. Esto último, puede relacionarse con el hecho de ser las únicas

emulsiones de ISPS que presentaron un proceso de cremado incipiente luego de los 28 días de almacenamiento (**Figura 4.9**).

El aumento del índice de consistencia y en especial, la disminución de **n** (mayor pseudoplasticidad) estarían asociados a un incremento en el GF de las emulsiones (**Tabla 4.5**). Por otro lado, las emulsiones con mayor consistencia presentan una mayor viscosidad **Figura 4.11**. Las constantes reológicas en polisacáridos insolubles de soja se determinaron luego de ser desfloculadas por una velocidad de cizalla de 200S^{-1} por un minuto. Los diferentes reogramas muestran un overshoot o un sobre esfuerzo, esto impidió la obtención de un umbral de fluencia τ_0 reproducible y el ajuste por el modelo de Herschell-Bulkley. Se aclara que las constantes reológicas fueron determinadas a la vuelta (**Anexo 1 y 2**). ISPS e ISPS-S presentaron la mayor consistencia, resultados relacionados con el aumento de tamaños de la DTP y la alta estabilidad frente al cremado (**Tabla 4.6**). La disminución del parámetro **n** para las fracciones S-OK y S-ISPS indica una mayor pseudoplasticidad y menor viscosidad a pH 3,0. Solo la fracción S-OK a pH 4,5 ($8,54\text{Pa}\cdot\text{s}$) aumentó su viscosidad con respecto a pH 3,0 ($2,36\text{Pa}\cdot\text{s}$) como se pueden ver en la **Figura 4.12**. Esto último, puede deberse a un efecto de la agregación de las proteínas en presencia de un pH cercano a su punto isoeléctrico, produciendo una mayor resistencia al flujo.

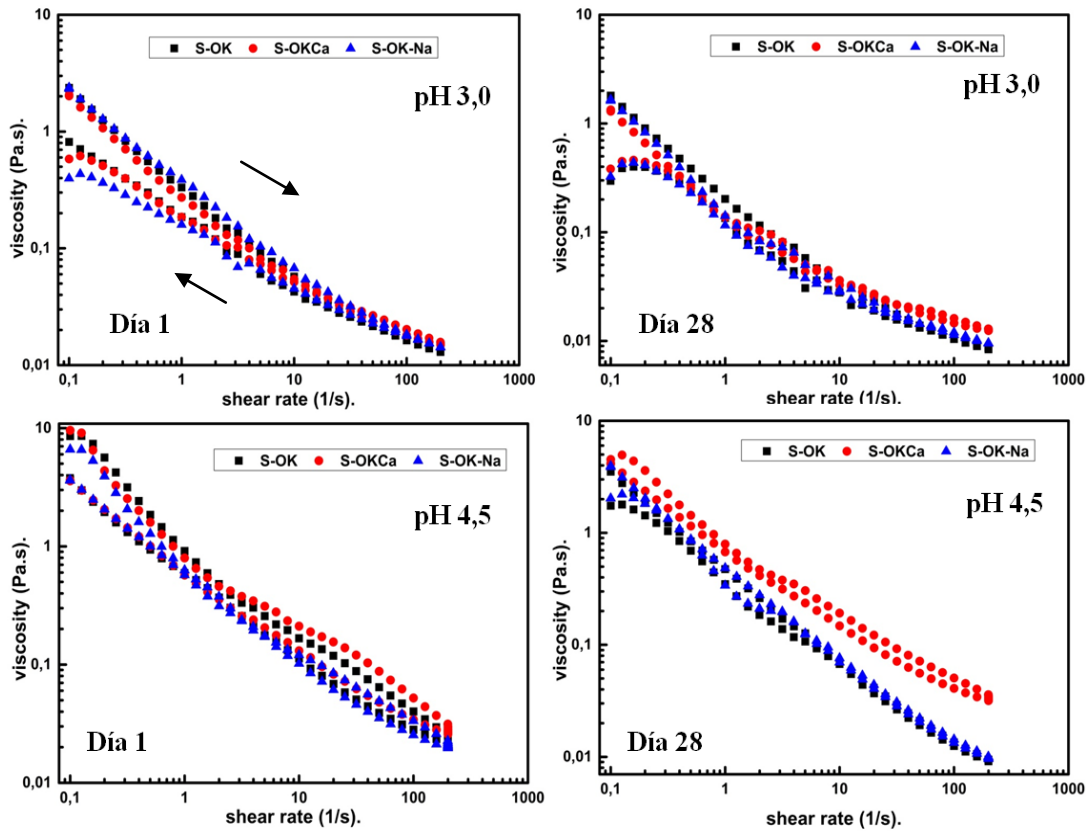


Figura 4.12. Reogramas viscosidad vs shear rate, en emulsiones finas O/W de fracciones okara (4,0% m/m): a) S-OK día 1, b) S-OK día 28, a y b a pH 3,0 con el agregado de sales, c) S-OK día 1 y d) S-OK día 28, a y b a pH 4,5 con el agregado de sales. Valores medios ($n = 3$).

4.4 Conclusiones parciales

- ✓ En emulsiones gruesas, todas las fracciones de Okara, independientemente del pH, presentaron una DTP multimodal; el aumento de la concentración de las fracciones de Okara hizo que los diámetros de De Brouckere disminuyeran. S-OK presentó los diámetros promedio D[4,3] más pequeños con respecto a las otras fracciones de okara tanto a pH 3,0 como a pH 4,5.

- ✓ El aumento de los tamaños de partícula en condiciones de pH isoelectrico podría estar directamente influenciado por la neutralización de las cargas de las proteínas y por encontrarse en la condición de menor solubilidad de las mismas, afectando directamente sus propiedades emulsificantes.

- ✓ La fracción S-OK, con la adición de sales de NaCl y CaCl₂, presentó la mayor estabilidad frente a la separación gravitacional, siendo la misma de 0%. Por otro lado, las emulsiones a pH 4,5, se desestabilizaron a una mayor velocidad con un 35% de fase acuosa separada; esto pudo apreciarse desde el primer minuto. El pH presentó un rol muy importante sobre el comportamiento de las emulsiones formuladas con S-OK.

- ✓ Las emulsiones finas formuladas con la fracción S-OK a pH 3,0, exhibieron tamaños de gotas D[4,3] entre 10,7 a 12,2µm. En cambio, a pH 4,5, todas las

emulsiones formuladas con las fracciones de S-OK mostraron tamaños de gotas superiores a 50 μ m. El incremento del pH modificaría claramente el comportamiento interfacial de las proteínas; al igual que en las emulsiones gruesas, el pI limitaría la actividad de las proteínas, afectando la capacidad emulsificante y aumentando el tamaño de partícula inicial. Por otro lado, el agregado de sales no modificó significativamente el tamaño de partícula inicial, sin embargo, esta adición generó una mayor estabilidad del tamaño de partícula en el tiempo a pH 3,0. Adicionalmente, se observó que, en condiciones de pH 4,5, la adición de sales permitió disminuir el tamaño de partícula inicial. Probablemente, las interacciones entre este emulsionante y las sales adicionadas podrían tener un efecto importante en la generación de un film interfacial más resistente permitiendo la interacción a nivel interfacial entre las estructuras proteicas y los polisacáridos, y manteniendo una estructura de flóculos más compacta.

- ✓ La evolución de los perfiles de BS de las emulsiones O/W de S-OK presentaron una alta estabilidad. Los valores iniciales de BS% fueron de 90% a pH 3,0 y de 80% a pH 4,5. La estabilidad general de las diferentes emulsiones, se asoció en todos los casos a bajos valores de TSI (< 11%), presentando una estabilidad mayor con el agregado de sales. Esto último, en concordancia con lo analizado previamente.

- ✓ El análisis reológico permitió comprobar la influencia de esta fracción sobre la viscosidad de las emulsiones. Particularmente, como se puede observar en los análisis previos, la adición de sales promovería una mayor rigidez en la estructura de estas emulsiones impidiendo una desestabilización acelerada. Esta rigidez podría relacionarse a la mencionada presencia de flóculos en todos los sistemas, presentando una estructura más compacta en las emulsiones formuladas en valores cercanos al pH isoelectrico, con la presencia de una fase continua de mayor viscosidad.
- ✓ Todas las emulsiones formuladas con fracciones de polisacáridos insolubles de soja mostraron valores iniciales $D[4,3]$ sin variaciones considerables a lo largo del tiempo. S-ISPS generó las emulsiones con menores tamaños de gota durante su almacenamiento, con grados de floculación mayores al 40% a ambos pH. A diferencia de la fracción de okara, las fracciones ISPS no se vieron afectadas en forma importante por la influencia del pH. En este tipo de fracciones, las proteínas que brindan la actividad emulsificante no estarían relacionadas a las proteínas de reserva de la soja, y por ello, no se ven afectadas en condiciones de pH cercanas a las del punto isoelectrico.

- ✓ ISPS e ISPS-S tienen valores de BS% de 80 y S-ISPS de casi 90%. Este aumento se debe principalmente a los menores tamaños de gotas presentes en las emulsiones formuladas con ISPS-S. Se observó un aumento de la estabilidad frente al cremado con respecto a la fracción S-OK. Por otra parte, el pH y el agregado de sales no tuvieron un efecto significativo sobre el proceso de desestabilización global. Los bajos valores de TSI (<8,4%) podrían atribuirse a la presencia de una fuerte red de partículas generando una alta viscosidad, que dificulta la migración de las gotas a la parte superior del tubo. Estos resultados resaltan la importancia de las propiedades de los polisacáridos insolubles de soja para la incorporación en la formulación de emulsiones alimenticias. También, la posibilidad de la inclusión de sales de sodio y calcio en formulaciones para el desarrollo de emulsiones ácidas.
- ✓ Las emulsiones formuladas con ISPS e ISPS-S presentaron una mayor resistencia a la deformación con respecto a la fracción S-ISPS. Por otro lado, el agregado de sales no generó un efecto significativo a los esfuerzos aplicados a excepción de algunas de las emulsiones formuladas con la fracción S-ISPS. Esta mayor resistencia a la deformación se relaciona directamente con el aumento de la viscosidad por presencia de flóculos.

Conclusiones finales

- ✓ Se lograron obtener diferentes fracciones derivadas de un subproducto de la industria aceitera como la harina desgrasada de soja. Estas fracciones se obtuvieron a partir del residuo insoluble de una extracción alcalina (okara) o una extracción alcalina sumada a una extracción en condiciones ácidas (ISPS) sobre dicha harina. Sobre este proceso se analizó también el efecto de un tratamiento de sonicación previo o posterior a la extracción en condiciones alcalinas.
- ✓ Las fracciones de polisacáridos insolubles (okaras e ISPS) presentaron diferencias considerables a nivel composicional, según su proceso de obtención. Sin embargo, en todos los casos sus componentes mayoritarios fueron proteínas y polisacáridos de alto peso molecular. Todas las fracciones, presentaron actividad superficial disminuyendo la tensión de equilibrio en la interfase, acompañada de un film interfacial de características viscoelásticas, permitiendo una mayor resistencia frente al proceso de coalescencia.
- ✓ El proceso de sonicación previo al tratamiento alcalino, permitió recuperar la fracción de okara con el mayor contenido de proteínas (S-OK) y, por lo tanto, un mayor rendimiento de obtención. Este aumento atribuido a un fenómeno de

insolubilización de estructuras proteicas relacionadas con una proteína de reserva de la soja, denominada glicinina (Fracción 11S) producido debido al fenómeno de cavitación a pH alcalino, que desplegaría dichas proteínas exponiendo residuos hidrofóbicos, que darían como resultado la formación de agregados. Por otro lado, el tratamiento de sonicación, pos tratamiento alcalino (OK-S), no generó una modificación composicional importante respecto al okara no sonificado (OK), pero sí generó cambios a nivel estructural y funcional. Estos resultados resaltan la incidencia del proceso de sonificado en las diferentes etapas de extracción donde es aplicado.

- ✓ Las fracciones de ISPS sometidas a sonicación (S-ISPS e ISPS-S) presentaron estructuras con un mayor tamaño respecto a la fracción sin tratamiento (ISPS). Estas diferencias podrían relacionarse a la presencia de agregados compactos de gran tamaño en las muestras sonicadas. En términos generales, las fracciones ISPS presentaron un aumento en la solubilidad proteica y las propiedades tensioactivas respecto a las muestras de okara. Esto se relacionaría con las condiciones de acidez y alta temperatura/presión generadas durante el proceso de obtención, produciendo reacciones de hidrólisis y/o desamidación en las estructuras proteicas.

- ✓ Las fracciones generadas mediante un proceso de sonicación previo tratamiento alcalino (S-OK y S-ISPS), generaron las emulsiones con menores tamaños de partícula a ambos pH.
- ✓ La actividad emulsificante de la fracción S-OK se vio levemente afectada por la agregación de las proteínas en cercanías al punto isoeléctrico de las proteínas de la soja (pH 4,5). Por otro lado, esta propiedad funcional no fue afectada en forma considerable, por variaciones en las condiciones de pH, cuando se utilizó la fracción S-ISPS

La adición de sales (NaCl y CaCl₂) en las emulsiones formuladas con las fracciones de okara tuvo una actividad diferencial según el pH. A pH 3, permitieron la formación de un film interfacial más resistente durante el almacenamiento, posiblemente debido a interacciones electrostáticas con las macromoléculas activas en la interfase. A pH 4,5, las sales permitieron una disminución inicial en el tamaño de las partículas, pero en este caso la estabilidad de emulsiones estaría directamente ligada con la formación de flóculos más compactos que evitaron una desestabilización acelerada. Por otro lado, la actividad emulsificante de las fracciones ISPS, al igual que con las condiciones de pH, tampoco generaron cambios importantes con la adición de sales.

- ✓ Los resultados obtenidos permiten inferir la posibilidad de obtención de fracciones derivadas de la harina de soja con propiedades emulsificantes adecuadas para su uso a nivel industrial y con la posibilidad de utilizarse, según el método de obtención aplicado, a diferentes condiciones de pH y contenido salino.

Referencias bibliográficas

- Abbas, S., Hayat, K., Karangwa, E., Bashari, M., Zhang, X. (2013). An overview of ultrasound-assisted food-grade nanoemulsions. *Food Eng. Rev.* 5, 139–157.
- Abismail, B., Canselier, J.P., Wilhelm, A.M., Delmas, H., Gourdon, C. (1999). Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrason. Sonochem.* 6 (1–2), 75–83.
- Acosta, E. (2009). Bio availability of nano particles in nutrient and nutraceutical delivery. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 14, 3–15.
- AdheebUsaid, A.S., Premkumar, J., Ranganathan, T.V. (2014). Emulsion and its Applications in Food Processing—a review. *Int. J. Eng. Res. Appl.* 4 (4), 241–248.
- Agrofy News. (2020). Récord: en siete meses el campo exportó todo lo de 2020. <https://news.agrofy.com.ar/noticia/195068/record-siete-meses-campo-exporto-todo-2020>.
- Akhtar, M., & Dickinson, E. (2007). Whey protein–maltodextrin conjugates as emulsifying agents: an alternative to gum arabic. *Food Hydrocoll.* 21, 607–616.
- Al Loman, A., & Ju, L.K. (2017). Enzyme-based processing of soybean carbohydrate: Recent developments and future prospects. *Enzyme Microb. Technol.* 106, 35–47.
- Amine, C., Dreher, J., Helgason, T., Tadros, T. (2014). Investigation of emulsifying properties and emulsion stability of plant and milk proteins using interfacial tension and interfacial elasticity. *Food Hydrocoll.* 39, 180–186.
- Anton, N., Benoit, J.P., Saulnier, P. (2008). Design and production of nano particles formulated from nano-emulsion templates—a review. *J. Control. Release* 128 (3), 185–199.
- Anton, N., Vandamme, T.F. (2009). The universality of low-energy nano emulsification. *Int. J. Pharm.* 377 (1–2), 142–147.
- AOAC international. Official methods of analysis. Volume 1, 15th edition 1990, JAOAC 37,253 (1954), pp. 69-80.
- Aspinall, G.O., & Whyte, J.N.C. (1964). Polysaccharides of soy-beans. Part I. Galactomannans from the hulls. *J. Chem. Soc. D*, 0, 5058e5063.
- Badley, R. A., Atkinson, D., Hauser, H., Oldani, D., Green, J.P., Stubbs, J.M. (1975). The structure physical and chemical properties of the soybean protein glycinin. *Biochim Biophys Acta*, 469, 214–228.
- Bagherian, H., Ashtiani, F.Z., Fouladitajar, A., Mohtashamy, M. (2011). Comparisons between conventional, microwave- and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit, *Chem. Eng. Process.* 50 1237-1243.

- Bajpai, P. (2018). Química de superficies y coloides. Manual de pulpa y papel de Biermann, 381–400.
- Baldursdottir, S.G., Fullerton, M.S., Nielsen, S.H., Jorgensen, L.(2010). Adsorption of proteins at the oil/water interface—Observation of protein adsorption by interfacial shear stress measurements. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 79, 41–46.
- Barford, N.M., Krog, N., and Bucheim, W.(1987). Protein fat surfactant interactions in whippable emulsions, in *Food Emulsions and Foams*, Dickinson E., Ed., Royal Society of Chemistry, Cambridge, 141.
- Benichou, A., Aserin, A., Garti, N. (2002). Protein-polysaccharide interactions for stabilization of food emulsions. *J. Dispers. Sci.* 23:93- 123.
- Benichou, A., Aserin, A., Lutz, R., Garti, N. (2007). Formation and characterization of amphiphilic conjugates of whey protein isolate (WPI)/xanthan to improve surface activity. *Food Hydrocoll.* 21 (3), 379–391.
- Berk Z (1992). Technology of production of edible flours and protein products from soybeans. *FAO Agricultural Services Bulletin* No. 97. Página web: <http://www.fao.org/docrep/t0532e/t0532e00.htm>. Último acceso: febrero 2016.
- Boode, K., (1992). Partial Coalescence in Oil-in-Water Emulsions, Ph.D. thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen, Netherlands.
- Bolsa de Cereales. (2021). Cierre de campaña de Soja 2020/21: ¿Cuál es la contribución esperada de la cadena sojera a la economía argentina en 2021?. <https://www.bolsadecereales.com/post-14>
- Bolsa de Cereales. (2023). Panorama Agrícola Semanal (PAS). Rendimientos esperados por debajo a los mínimos históricos de la serie pas reducen nuestras estimaciones de producción de soja y maíz <https://www.bolsadecereales.com/imagenes/pass/2023-03/970-pas20230316.pdf>
- Bouchemal, K., Briancon, S., Perrier, E., Fessi, H. (2004). Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *Int. J. Pharm.* 280 (1–2), 241–251.
- Boufaïed, H., P. Y. Chouinard, G. F. Tremblay, H. V. Petit, R. Michaud, G. Bélanger. (2003). Fatty acids in forages. I. Factors affecting concentrations. *Can. J. Anim. Sci.* 83:501–511.
- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part C*, 151–159.
- Cagri, A. Ustunol, Z. Ryser, E.T. (2004). Antimicrobial edible films and coatings. *J. Food Prot.* 67 (4) 833–848.
- Campbell, I., Norton, I., and Morley, W.(1996). Factors controlling the phase inversion of oil-in-water emulsions. *Neth. Milk Dairy J.* 50, 167.
- Chanamai, R., & McClements, D.J. (2001). Depletion flocculation of beverage emulsions by gumarabic and modified starch. *J. FoodSci.* 66, 457–463.

- Chanamai, R., &McClements, D.J. (2002). Comparison of gumarabic, modified starch, and whey protein isolate as emulsifiers: influence of pH, CaCl₂ and temperature. *J. FoodSci.* 67, 120–125.
- Chang, Q. (2016). Breve historia de la química de interfases y coloides y conceptos básicos. *Química de interfase y coloides para el control de la calidad del agua*, 1–12.
- Cheftel, J.-C., Cuq, J. L. y Lorient, D. (1989). *Proteínas alimentarias*. Ed. Acribia S.A., Vol. 6., Zaragoza,pp.257- 275.
- Chevalier, F., Chobert, J.M., Popineau, Y.(2001). Improvement of functional properties of b-lactoglobulin glycated through Maillard reaction is related to the nature of the sugar. *Int. Dairy J.* 11, 145–152.
- Chu, B.S., Ichikawa, S., Kanafusa, S., Nakajima, M. (2007). Preparation and characterization of β -carotene nano dispersions prepared by solvent displacement technique. *J. Agr. FoodChem.* 55 (16), 6754–6760.
- Chung, C., Sher, A., Rousset, P., Decker, E.A., McClements, D.J. (2017). Formulation of food emulsions using natural emulsifiers: utilization of quillaja saponin and soy lecithin to fabricate liquid coffee whiteners. *J. Food Eng.* 209, 1–11.
- Coffler, T. (2022). Effect of Interfacial Rheology on the Stability of Water-Oil Emulsion. Tesis de doctorado. Rio de Janeiro. Brazil.
- Colletti, Analía C.; Delgado, Juan Francisco; Cabezas, Dario M.; Wagner, Jorge R.; Porfiri, María C. (2020). Soybean Hull Insoluble Polysaccharides: Improvements of Its Physicochemical Properties Through High Pressure Homogenization. *Food Bioph.*15,173–187.
- Coimbra, M.A., Barros, A., Barros, M., Rutledge, D.N.,Delgadillo, I. (1998). Multivariate 642 analysis of uronic acid and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy. *Carbohydr. Polym.* 37(3), 241-248.
- Demetriades, K., Coupland, J.N., McClements, D.J., (1997)a. Physical properties of whey protein stabilized emulsions as related to pH and NaCl. *J. Food Sci.* 62, 342.
- Demetriades, K., Coupland, J.N., McClements, D.J. (1997)b.Physico chemical properties of whey protein stabilized emulsions as affected by heating and ionic strength. *J. Food Sci.* 62, 462.
- Derkach, S., Krägel, J. , Miller, R. (2009). Methods of measuring rheological properties of interfacial layers (experimental methods of 2d rheology). *Colloid J.* 71(1):1–17.
- Dev, S.B., Keller, J.T. & Rha, C.K. (1988). Secondary structure of 11 S globulin in aqueous solution investigated by FT-IR derivative spectroscopy. *BiochimBiophys Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 957, 272–280.
- Dickinson, E. & Stainsby, G. (1982). *Colloids in Foods*, Applied Science Publishers, London.
- Dickinson, E., Galazka, V.B., Anderson, D.M.W. (1991). Emulsifying behaviour of gumarabic. *Carbohydr. Polym.* 14, 373–392.
- Dickinson, E. (1992). *Introduction to Food Colloids*, Oxford University Press, Oxford.

- Dickinson, E. & McClements, D.J.(1995). *Advances in Food Colloids*, Chapman & Hall, London.
- Dickinson, E. (1997). Properties of emulsions stabilized with milk proteins: overview of some recent developments. *J. Dairy Sci.* 80, 2607–2619.
- Dickinson, E. (1998) Structure, stability and rheology of flocculated emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 3: 633–638.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocoll.* 17, 25–39.
- Dickinson, E. (2008). Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein-polysaccharide interactions. *Soft Matter*, 4:932–942.
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilisers. *Food Hydrocoll.* 23, 1473-1482.
- Dickinson, E., (2010). Flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 81, 130–140.
- Dror, Y., Cohen, Y., Yerushalmi-Rozen, R. (2006). Structure of gum arabic in aqueous solution. *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.* 44, 3265–3271.
- Dukhin, S. & Sjöblom, J. (1996). Kinetics of Brownian and gravitational coagulation in dilute emulsions, in *Emulsions and Emulsion Stability*, Sjöblom, J., Ed., Marcel Dekker, New York.
- Everett, D.H. (1988). *Basic Principles of Colloid Science*, Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Evison, J., Dickinson, E., Owusu-Apenten, R.K., Williams, A.(1995). Formulation and properties of protein stabilized water-in-oil-in-water multiple emulsions, in *Food Macromolecules and Colloids*, Dickinson, E. and Lorient, D., Eds., Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 235.
- Eze, O. F., Chatzifragkou, A., Charalampopoulos, D. (2022). Properties of protein isolates extracted by ultrasonication from soybean residue (okara). *Food Chem.* 368, 130837.
- Fan, X., Chang, H., Lin, Y., Zhao, X., Zhang, A., Li, S., Chen, X. (2020). Effects of ultrasound-assisted enzyme hydrolysis on the microstructure and physicochemical properties of okara fibers, *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume 69, 105247, ISSN 1350-4177.
- Fang, J., Lu, J., Zhang, Y., Wang, J., Wang, S., Fan, H., Zhang, J., Dai, W., Gao, J., Yu, H. (2021). Structural properties, antioxidant and immune activities of low molecular weight peptides from soybean dregs (Okara). *Food Chem.* X12, 100175.
- Farinato, R.S. & Rowell, R.L. (1983). Optical properties of emulsions, in *Encyclopedia of Emulsion Technology*, Vol. 1, Becher, P., Marcel Dekker, New York, Chap. 8.
- Fayaz, G. Plazzotta, S. Calligaris, S. Manzocco, L. Nicoli, M.C. (2019). Impact of high pressure homogenization on physical properties, extraction yield and biopolymer structure of soybean okara. *Lwt.* 113, 108324.

- Feng, J.-Y., Wang, R., Thakur, K., Ni, Z.-J., Zhu, Y.-Y., Hu, F., ... Wei, Z.-J. (2021). Evolution of okara from waste to value added food ingredient: An account of its bio-valorization for improved nutritional and functional effects. *Trends Food Sci.* 116, 669–680.
- Fernandez, P., Andre, V., Rieger, J., Kuhnle, A. (2004). Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects* 251, 53–58.
- Fincher, G.B., Stone, B.A., Clarke, A.E. (1983). Arabinogalactan-Proteins: Structure, biosynthesis, and function. *Annu. Rev. PlantPhysiol.* 34, 47-70.
- Fortunato, R. (2018). Proteínas de okara de soja como agentes emulsificantes en mezclas con proteínas y lecitina de soja. Tesina de pregrado.
- Freitas, S., Merkle, H.P., Gander, B. (2005). Micro encapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *J. Control. Release* 102 (2), 313–332.
- Friberg, S.E., Larsson, K., Sjobolom, J.(2004). *Food Emulsions*, fourth ed. Marcel Dekker, New York, NY.
- Fujii, N. Tobe, J. Nakamura, A. Yoshida, R. (2010). Method for production of water-soluble polysaccharide. Fuji Oil Company, Limited, Patent US8128980 B2.
- Fukuda, M., Sugihara, Y., Itou, M., Horiuchi, R., Asao, H. (2006). Effects of feeding with okara on plasma and liver lipid levels in rats. *J. Jap Soc. FoodSci. Technol.* 53, 195–199.
- Fukushima, D. (1991). Recent progress of soybean protein foods: Chemistry, technology, and nutrition. *Food Rev. Int.* 7, 323–351.
- Fung, W.-Y., & Liong, M.-T. (2010). Evaluation of proteolytic and ACE-inhibitory activity of *Lactobacillus acidophilus* in soy whey growth medium via response surface methodology. *LWT* 43(3), 563–567.
- Furuta, H., Takahashi, T., Tobe, J., Kiwata, R., Maeda, H. (1998). Extraction of water-soluble soybean polysaccharides under acidic conditions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 2300–2305.
- Gadhav, A.D. (2014). Nanoemulsions: formation. Stability and applications. *Int. J. Res. Sci. Adv. Technol.* 2 (3), 38–43.
- Galazka, V.B., Dickinson, E., Ledward, D.A. (1999). Emulsifying behaviour of 11S globulin *Vicia faba* in mixtures with sulphated polysaccharides: comparison of thermal and high-pressure treatments. *Food Hydrocoll.* 13, 425–435.
- Goff, H.D., Liboff, M., Jordon, W.K., Kinsella, J.E. (1987). The effect of polysorbate on the fat emulsion of ice-cream mix: Evidence from transmission electron microscopy studies. *Food Microstruct.* 6, 193.
- Goff, H.D., (1993). Interactions and contributions of stabilizers and emulsifiers to development of structure in ice-cream, in *Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties*, Dickinson, E. and Walstra, P., Eds., Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp.71.
- Goff, H.D. (1997). Colloidal aspects of ice cream—A review. *Int. Dairy J.* 7, 363–373.

- Goff, H.D. (2000). Controlling ice-cream structure by examining fat–protein interactions. *Aust. J. Dairy Technol.* 55, 78–81.
- Gomes, C.I., Obendorf, R.L., Horbowicz, M. (2005). Myo-Inositol, D-chiro-inositol, and Dpinitolsynthesis, transport, and galactoside formation in soybean explants, *CropSci.* 45, 1312–1319.
- Guo, M. (2009). Soy Food Products and their Health Benefits. *Funct. Foods.* 237-277.
- Guo, P., Wang, Y., Zhou, X., Xie, Y., Wu, H., & Gao, X. (2013). Expression of soybean lectin in transgenic tobacco results in enhanced resistance to pathogens and pests. *PlantSci.* 211, 17–22.
- Gutierrez, J.M., Gonzalez, C., Maestro, A., Sole, I., Pey, C.M., Nolla, J. (2008). Nano emulsions: new applications and optimization of their preparation. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 13 (4), 245–251.
- Guzey, D. and McClements, D.J. (2006). Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Adv. Colloid Interface Sci.*128, 227–248.
- Henao, J.S. (2021). “Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades interfaciales y emulsionantes de proteínas de sueros de soja y de tofu para la formulación de emulsiones alimentarias ácidas, estables en condiciones de estrés tecnológico”. Tesis de doctorado.Universidad Nacional de Quilmes (UNQ).
- Henry, J.V.L., Fryer, P.J., Frith, W.J., Norton, I.T. (2010). The influence of phospholipids and food proteins on the size and stability of model submicron emulsions. *FoodHydrocoll.* 24 (1), 66–71.
- Herkelman, K. L, G. L. Cromwell, A. H. Cantor, T. S. Stahly, and T. W. Pfeiffer. (1993). Effects of heat treatment on the nutritional value of conventional and low trypsin inhibitor soybeans for chicks. *Poult. Sci.* 72:1359–1369.
- Hernandez, E., Baker, R.A., and Crandall, P.G. (1991). Model for evaluating the turbidity in cloudy beverages. *J Food Sci.* 56, 747.
- Hiemenz, P.C. (1986). *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, Dekker, New York.
- Higashitani, K., Yoshida, K., Tanise, N., Murata, H. (1993). Dispersion of coagulated colloids by ultrasonication. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*81(C), 167–175.
- Hu, H., Wu, J., Li-Chan, E.C.Y. et al. (2013). Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. *Food Hydrocoll.* 30, 647–655.
- Huck-Iriart, C., Álvarez-Cerimedo, M.S., Candal, R.J., Herrera, M.L. (2011). Structures and stability of lipid emulsions formulated with sodium caseinate. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 16 (5), 412–420.
- Huisman, M. M. H., Schols, H.A., & Voragen, A.G.J. (1998). Cell wall polysaccharides from soybean (*Glycine max.*) meal. Isolation and characterisation. *Carbohydr. Polym.* 37(1), 87–95.

- Huisman, M.M.H., Weel, K.G.C., Schols, H.A., & Voragen, A.G.J. (2000). Xyloglucan from soybean (*Glycine max*) meal is composed of XXXG-type building units. *Carbohydr. Polym.* 42(2), 185–191.
- Hunter, R.J. (1986). *Foundations of Colloid Science*, Vol. 1, Oxford University Press, Oxford.
- Hunter, R.J. (1989). *Foundations of Colloid Science*, Vol. 2, Oxford University Press, Oxford.
- Hunter, W. (2011). Preface. In *Recent Advances and Issues in Environmental Science*.
- Jaensson, N., & Vermant, J. (2018). Tensiometry and rheology of complex interfaces. *Curr. Opin. Colloid Interface* 37:136–150.
- Jafari, S.M., He, Y.H., Bhandari, B. (2006). Nano-emulsion production by sonication and micro fluidization—a comparison. *Int. J. Food Prop.* 9 (3), 475–485.
- Jafari, S.M., He, Y., Bhandari, B. (2007). Production of sub-micron emulsions by ultrasound and micro fluidization techniques. *J. Food Eng.* 82 (4), 478–488.
- Jourdain, L., Leser, M. E., Schmitt, C., Michel, M., and Dickinson, E. (2008). Stability of emulsions containing sodium caseinate and dextran sulfate: Relationship to complexation in solution. *Food Hydrocoll.* 22 (4), 647–659.
- Kabalnov, A.S. & Shchukin, E.D. (1992). Ostwald ripening theory: Applications to fluorocarbon emulsion stability. *Adv. Colloid Interface Sci.* 38, 69.
- Karki, B., Lamsal, B. P., Jung, S., van Leeuwen, J., Pometto, A. L., Grewell, D., Khanal, S. K. (2010). Enhancing protein and sugar release from defatted soy flakes using ultrasound technology. *J. Food Eng.* 96(2), 270–278.
- Karshikoff, A. (2006). *Non-covalent interactions in proteins*. Imperial College Press.
- Kentish, S., Wooster, T.J., Ashokkumar, A., Balachandran, S., Mawson, R., Simons L., (2006). The use of ultrasonics for nano emulsion preparation. In: *3rd Innovative Foods Centre Conference on Food Innovation: Emerging Science, Technologies and Applications*. Melbourne, Australia, pages 170–175.
- Kentish, S., Wooster, T.J., Ashokkumar, M., Balachandran, S., Mawson, R., Simons, L., (2008). The use of ultrasonics for nano emulsion preparation. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9 (2), 170–175.
- Khawas, P. & Deka, S.C. (2016). Isolation and characterization of cellulose nano fibers from culinary banana peel using high-intensity ultrasonication combined with chemical treatment. *Carbohydr. Polym.* 137 608-616.
- Kika, K., Korlos, F., and Kiosseoglou, V. (2007). Improvement, by dry-heating, of the emulsion-stabilizing properties of a whey protein concentrate obtained through carboxy methyl cellulose complexation. *Food Chem.* 104, 1153–1159.
- Kim, S.H., Kinsella, J.E. (1987a). Surface Active Properties of Food Proteins: Effects of Reduction of Disulfide Bonds on Film Properties and Foam Stability of Glycinin. *J. Food Sci.* 52, 128-131.
- Kim, S. H., Kinsella, J.E. (1987b). Surface Active Properties of Food Proteins: Effects of Reduction of Disulfide Bonds on Film Properties and Foam Stability of Glycinin. *J. Food Sci.*, 52, 1341-1352.

- Kimura, A., Fukuda, T., Zhang, M., Motoyama, S. (2008). Comparison of physicochemical properties of 7S and 11S globulins from pea, fababean, cowpea, and French bean with those of soybean—French vean 7S globulin exhibits excellent properties. *J. Agric. Food Chem.* 56, 10273–10279.
- Kinsella, J.E. (1979). Functional properties of soy proteins. *JAOCS* 56(3), 242–258.
- Kirk, R.S., Sawyer, R., Egan, H. (1996). “Composición y Análisis de Alimentos de Pearson”. Segunda edición. Editorial CECSA. México.
- Kohyama, K., Murata, M., Tani, F., Sano, Y., Doi, E. (1995). Effects of protein composition on gelation of mixtures containing soybean 7S and 11S globulins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 240–245.
- Kosegarten, C., & Jiménez, M. (2012). Factores principales que intervienen en la estabilidad de una emulsión doble. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 1 – 18.
- Kunitz, M.J. (1946). Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.* 29, 149-154.
- Kunitz, M.J. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor II. *Gen. Physiol.* 30, 291-310.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Leong, T.S.H., Wooster, T.J., Kentish, S.E., Ashokkumar, M. (2009). Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrason. Sonochem.* 16 (6), 721–727.
- Li, B. Qiao, M. Lu, F. (2012). Composition, nutrition, and utilization of okara. *Food Rev. Int.* 28(3) 231-252.
- Li, J., He, Y., Anankanbil, S., Guo, Z. (2019). Phospholipid-Based Surfactants. *Biob. Surfactants*, 243–286.
- Lips, A., Westbury, T., Hart, P.M., Evans, I.D., and Campbell, I.J. (1993). Aggregation mechanisms in food colloids and the role of biopolymers, in *Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties*, Dickinson, E. and Walstra, P., Eds., Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp.31.
- Lyu. Bo, Wang. Huan, Sharif Swallah. Mohammed, Fu. Hongling, Shen. Yue, Guo. Zengwang, Tong. Xiaohong, Li. Yang, Yu. Hansong, Jiang. Lianzhou, (2021), Structure, properties and potential bioactivities of high-purity insoluble fibre from soybean dregs (Okara). *Food Chem.* 364, 130402.
- Lucassen-Reynders, E.H. (1993). Interfacial viscoelasticity in emulsions and foams. *Food Struct.*, 12:1–12.
- Luyten, H., Jonkman, M., Kloek, W., and van Vliet, T. (1993). Creaming behaviour of dispersed particles in dilute xanthan solutions, in *Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties*, Dickinson, E. and Walstra, P., Eds., Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp.224.
- Ma, W., Wang, J., Xu, X. et al. (2019). Ultrasound treatment improved the physicochemical characteristics of cod protein and enhanced the stability of oil-in-water emulsion. *Food Res. Int.* 121, 247–256.

- Maa, Y.F., & Hsu, C.C.(1999). Performance of sonication and micro fluidization for liquid-liquid emulsification. *Pharm. Dev. Technol.* 4 (2), 233–240.
- Maeda H (2000). Soluble Soybean Polysaccharide. En hand book of hydrocolloids, capitulo 17, Eds. Phillips G. O. y Williams P. A, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Maeda, H. & Nakamura, A. (2009). Polisacárido de soja soluble. *Manual de hidrocoloides*, pp.693–709.
- Maldonado, L., Latorre, K., Rocha, P., Medrano, A., Abirached, C. y Panizzolo, L.A. (2011). Influencia del pH en la estabilidad de emulsiones elaboradas con proteínas de salvado de arroz. *Revista del Laboratorio Tecnológico de Uruguay*6,28-31.
- Markwell, MAK, Haas, SM, Tolbert, NE y Bieber, LL (1981). Determinación de proteínas en muestras de membrana y lipoproteínas: Procedimientos manuales y automatizados. *Lípidos Parte D*, 296–303.
- Márquez A (2009). Obtención y caracterización de cremas formuladas a base de leche de soja y fortificadas con calcio. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Quilmes (UNQ).
- Mateos-Aparicio, I., Mateos-Peinado, C., Jiménez-Escrig, A.,Rupérez, P. (2010). Multifunctional antioxidant activity of polysaccharide fractions from the soybean by product okara. *Carbohydr.Polym.* 82(2), 245-250.
- Mengual, O., Meunier, G., Cayré, I., Puech, K., &Snabre, P. (1999). TURBISCAN MA 2000: Multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*, 50(2), 445– 456.
- McClements, D.J. (1999). *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*, CRC Press, NewYork. USA.
- McClements, D.J., (2004). Protein-stabilized emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 9, 305–313.
- McClements, D.J., (2005). *Food emulsions: principles, practice, and techniques*. CRC Series in Contemporary Food Science. second ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- McClements, D.J.(2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotech. Adv.* 24 (6), 621–625.
- McClements, D.J. (2010). Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. *Ann. Rev. FoodSci. Technol.* 1, 241–269.
- McClements, D.J., Rao, J.(2011). Food-grade nano emulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potentialtoxicity. *Crit. Rev. FoodSci. Nutr.* 51, 285–330.
- McClements, D.J. (2012). Fabrication, characterization and properties of food nano emulsions. In: Huang, Qingrong (Ed.), *Nano technology in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries*. Woodhead Publishing Limited, Elsevier B.V., Cambridge, UK, pp. 293–316.
- McNamee, B.F., O’Riordan, E.D., O’sullivan, M. (1998). Emulsification and micro encapsulation properties of gumarabic. *J. Agric. FoodChem.* 46, 4551–4555.
- Maeda H (2000). Soluble Soybean Polysaccharide. En *Handbook of Hydrocolloids*, Capítulo 17, Eds. Phillips G. O. y Williams P. A, CRC Press, Boca Ratón, USA.

- Maestro, A., Solè, I., González, C., Solans, C., Gutiérrez, J.M. (2008). Influence of the phase behavior on the properties of ionic nano emulsions prepared by the phase inversion composition method. *J. Colloid Interface Sci.* 327, 433–439.
- Magni, C., Sessa, F., Capraro, J., Duranti, M., Maffioli, E., Scarafoni, A. (2018). Structural and functional insights into the basic globulin 7S of soybean seeds by using trypsin as a molecular probe. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 496(1), 89–94.
- Mason, T.G., Graves, S.M., Wilking, J.N.L.M. (2006). Extreme emulsification: formation and structure of nano emulsions. *Condens. Matter Phys.* 9, 193–199.
- Matsumoto, K.; Y. Watanabe; S. Yokoyama. (2007). Okara, soybean residue, prevents obesity in a diet-induced murine obesity model. *Bosci. Biotech. Biochem.* 71, 720–727.
- Mikula, R.J., (1992). Emulsion characterization, in *Emulsions: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry*, Schramm, L.L., Ed., American Chemical Society, Washington, D.C., Chap. 3.
- Minjares-Fuentes, R. Femenia, A., Garau, M.C., Candelas-Cadillo, M.G., Rossello, S.C. (2016). Ultrasound-assisted extraction of hemicelluloses from grape pomace using response surface methodology, *Carbohydr. Polym.* 138 180-191.
- Moczowska, M., Karpa, S., Niub, Y., Kurek, M.A. (2019). Enzymatic, enzymatic ultrasonic and alkaline extraction of soluble dietary fibre from flax seed – A physico-chemical approach, *Food Hydrocoll.* 90 105-112.
- Molina Ortiz, S.E. & Wagner, J.R. (2002). Hidrolizados de aislados de proteína de soja nativos y modificados: características estructurales, solubilidad y propiedades espumantes. *Food Res. Int.* 35(6), 511–518.
- Moran, D.P.J. (1994). Fats in spreadable products, in *Fats in Food Products*, Blackie Academic and Professional, London.
- Morita, M. (1965). Polysaccharides of soybean seeds: Polysaccharide constituents of hotwater-extract fraction of soybean seed and an arabinogalactan as its major component. *Agr. Biol. Chem.* 29, 564-573.
- Morrison, I.M. (1988). Hydrolysis of plant cell walls with trifluoroacetic acid. *Phytochem.* 27(4), 1097–1100.
- Moscoso Ospina, Y.A., Porfiri, M.C., Cabezas, D.M. (2022). Soybean okara: Effect of ultrasound on compositional and emulsifying properties. *Int J. Food. Sci. Technol.* 57: 3914-3923.
- Mujoo, R., Trinh, D.T., Ng, P.K.W. (2003). Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relation to tofu yield and texture. *Food Chem.* 82, 840–842.
- Mulder, H. & Walstra, P. (1974). *The Milk Fat Globule: Emulsion Science as Applied to Milk Products and Comparable Foods*, Pudoc, Wageningen, Netherlands.
- Muller HG (1973). *Introducción a la Reología de los Alimentos*. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

- Nagano, T., Hirotsuka, M., Mori, H., Kohyama, K., & Nishinari, K. (1992). Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans. *J. Agric. Food Chem.* 40, 941–944.
- Nakamura, A., Furuta, H., Kato, M., Maeda, H., Nagamatsu, Y. (2003). Effect of soybean soluble polysaccharides on the stability of milk protein under acidic conditions. *Food Hydrocoll.* 17, 333-343.
- Nakauma, M., Funami, T., Noda, S. (2008). Comparison of sugar beet pectin, soybean soluble polysaccharide, and gumarabic as food emulsifier. 1. Effect of concentration, pH, and salts on the emulsifying properties. *Food Hydrocoll.* 22, 1254–1267.
- Ngouémazong, E.D., Christiaens, S., Shpigelman, A., VanLoey, A.Hendrickx, M. (2015). The emulsifying and emulsion-stabilizing properties of pectin: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 14, 705-718.
- Nir, I.F., Aserin, A.Y., & Garti, N. (1994). Surface properties and emulsification behavior of soy proteins. *J. Food Sci.* 59, 606–610.
- Nilsson, L., & Bergenstahl, B. (2006). Adsorption of hydrophobically modified starch at oil/water interfaces during emulsification. *Langmuir* 22, 8770–8776.
- Nilsson, L., Bergenstahl, B. (2007). Adsorption of hydrophobically modified anionic starch at opposite ly charged oil/water interfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 308, 508–513.
- Nylander, T., Arnebrant, T., Bos, M., Wilde, P. (2008). Protein/emulsifier interactions. In: Hasenhuettl, G.L., Hartel, R.W. (Eds.), *Food Emulsifiers and Their Applications*, second ed. Springer, New York, pp. 89–171.
- O'Toole, D.K. (2004). Soybean: Soymilk, Tofu, and okara. In C. Wrigley (Ed.), *Encyclopedia of grain science* (pp. 185e195). Cambridge: Elsevier Ltd.
- Palazolo, G. G., Sorgentini, D. A., Wagner, J.R. (2005). Coalescence and flocculation in o/w emulsions of native and denatured whey soy proteins in comparison with soy protein isolates. *Food Hydrocoll.* 19, 595–604.
- Palazolo G.G. (2006). Formación y estabilidad de emulsiones O/W preparadas con proteínas nativas y desnaturalizadas de soja. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP).
- Pan, L.G., Tomás, M.C., Añón, M.C. (2002). Effect of sunflower lecithins on the stability of water-in-oil and oil-in-water emulsions. *J. Surfactants Deterg.* 5(2), 135–143.
- Pandolfini, P., Loglio, G., Ravera, F., Liggieri, L., Kovalchuk, V., Javadi, A., Karbaschi, M., Krägel, J., Miller, R., Noskov, B. et al. (2017). Dynamic properties of span-80 adsorbed layers at paraffin-oil/water interface: Capillary pressure experiments under low gravity conditions. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 532, 228–243.
- Pearson, A.M. (1983). Soy proteins. In B. J. F. Hudson (Ed.), *Developments in food proteins—2* (pp. 67–108). Essex: Applied Science Publishers.

- Pearson, D. (1998). *Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos*; Acribia, S.A. Zaragoza (España).
- Peng, I.C., Quass, D.W., Dayton, W.R., Allen, C.E. (1984). The Physicochemical and Functional Properties of Soybean 11S Globulin - A Review. *Cereal Chem.* 61, 480-490.
- Perez, R.A., Mannion, P.F., Farrell, D.J. (2003). Effects of heat treatment on the nutritional value of raw soybean selected for low trypsin inhibitor activity. *Br. Poult. Sci.* 44:299–308.
- Perkins, E.G. (1995). Composition of Soybeans and Soybean Products. *Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization*, pp.9–28.
- Peumans, W.J. Van Damme, E.J.M. (1995). Lectins as plant defence proteins, *Plant Physiol.* 109, 347–352.
- Phillips, L. G., Whitehead, D. M., & Kinsella, J. (1994). Functional Properties of Modified Proteins. *Structure– Function Properties of Food Proteins*, pp.233–249.
- Pilosof, A.M.R. (2000). Propiedades de hidratación. En *Caracterización Funcional y Estructural de Proteínas*. Pilosof, A. M. R y Bartholomai, G. B. (Editores) 1era Edición EUDEBA. ISBN 950-23-1023-3, pp 17-23
- Piorkowski, D.T., McClements, D.J., (2014). Beverage emulsions: recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocoll.* 42, 5–41.
- Porfiri, M.C., Cabezas, D.M., Wagner, J.R. (2016). Comparative study of emulsifying properties in acidic condition of soluble polysaccharides fractions obtained from soy hull and defatted soy flour. *J. Food Sci. Technol.* 53(2), 956–967.
- Porfiri, M.C., Vaccaro, J., Stortz, C.A., Navarro, D.A., Wagner, J.R., Cabezas, D.M. (2017). Insoluble soybean polysaccharides: Obtaining and evaluation of their O/W emulsifying properties. *Food Hydrocoll.* 73, 262-273.
- Pratab, A., Taware, S.P., Raut, V.M.(2004). Quality of Indian soybean (*Glycinemax* (L.) Merrill) varieties in relation to fatty acids composition. *Indian J. Genet. Plant Breed.* 64,245-246.
- Producción Mundial de Soja 2022/2023. *Produccionagricolamundial.com*. Recuperado de: <http://www.produccionagricolamundial.com/cultivos/soja.aspx>. 23 de Agosto del 2023.
- Probst, A.H., Judd, R.W. (1973). Origin, US History and development, and World Distribution. In: Caldwell, B.E. (Ed), *Soybean: Improvement, Production, and Uses*. AgronMongr. 16. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI, pp. 1-15.
- Qian, C., & McClements, D.J. (2011). Formation of nano emulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: factors affecting particle size. *Food Hydrocoll.* 25 (5), 1000–1008.
- Rampon, V., Brossard, C., Mouhous-Riou, N., Bousseau, B.T., Llamas, G., Genot, C. (2004). The nature of the apolar phase influences the structure of the protein emulsifier in oil-in-water emulsions stabilized by bovine serum albumin.: a front-surface fluorescence study. *Adv. Colloid Interface Sci.* 108-109, 87–94.

- Ranaldi, V.E.A., Ng,P.K.W, Bennik, M.R. (2000). Effects of extrusion on dietary fiber and isoflavone contents of wheat extrudates enriched with wet okara. *Cereal Chem.* 77, 237–240.
- Rawle, A. (2005). Basic principles of particle analysis. Malvern Mastersizer Limited, technical paper.
- Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suarez, M. J., & Mateos-Aparicio, I. (2008). Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and Englyst methods. *Food Chem.* 108, 1099e1105.
- Robins, MM & Wilde, PJ (2003). COLOIDES Y EMULSIONES. Enciclopedia de ciencias de la alimentación y nutrición, pp.1517–1524.
- Ruperez, P., Selvendran, R. R., & Stevens, B. J. H. (1985). Investigation of the heterogeneity of xyloglucans from the cell walls of apple. *Carbohydr. Res.* 142(1), 107–113.
- Santini, E., Liggieri, L., Sacca, L., Clause, D. , Ravera, F. (2007). Interfacial rheology of span 80 adsorbed layers at paraffin oil– water interface and correlation with the corresponding emulsion properties. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 309, 270–279.
- Sceni, P., & Wagner, J.R. (2007). Study on sodium caseinate foam stability by multiple light scattering. *Food Sci Technol Int.* 13(6), 461–468.
- Schubert, H., Engel, R. (2004). Product and formulation engineering of emulsions. *Chem. Eng. Res. Design* 82 (A9), 1137–1143.
- Schultz, S., Wagner, G., Urban, K., Ulrich, J. (2004). High-pressure homogenization as a process for emulsion formation. *Chem. Eng. Technol.* 27 (4), 361–368.
- Shewry, P.R. Pandya, M.J. (1999). The 2S albumin storage proteins, in: P.R. Shewry, R. Casey (Eds.), *Seed Proteins*, Kluwer Academic, Netherlands, pp. 619 – 643.
- Shinoda, K. & Friberg, S. (1986). *Emulsions and Solubilization*, John Wiley & Sons, New York.
- Shinoda, K. y Takeda, H. (1970). El efecto de las sales añadidas en agua sobre el equilibrio hidrófilo-lipófilo de los tensioactivos no iónicos: El efecto de las sales añadidas sobre la temperatura de inversión de fase de las emulsiones. *Revista de ciencia de interfaces y coloides* , 32 , 642-646.
- Silva, H.D., Cerqueira, M.Â., Vicente, A. (2012). Nano emulsions for food applications: development and characterization. *Food Bioproc. Technol.* 5 (3), 854–867.
- Silva, S. S., Rodrigues, L. C., Fernandes, E. M., & Reis, R. L. (2020). Fundamentals on biopolymers and global demand. *Biopolymer Membranes and Films*, 3–34.
- Soja 360°: usos y derivados. (2020). *Agrofy News*. Argentina. Recuperado de <https://news.agrofy.com.ar/especiales/soja19-20/nuevos-usos-soja>.
- Steinhardt, J., & Beychok, S. (1964). Interaction of proteins with hydrogen ions and other small ions and macromolecules. In *The Proteins: composition, structure and function*, Volume 2, Ed. Neurath H, Academic Press, New York, USA, pp 140-304.

- Surel, O., & Couplet, B. (2005). Influence of the dehydration process on active compounds of okara during its fractionation. *J. Sci. Food Agric.* 85, 1343–1349.
- Tabibiazar, M., et al., (2015). Design and fabrication of a food-grade albumin stabilized nano emulsion. *Food Hydrocoll.* 44, 220–228.
- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., Solans, C. (2004). Formation and stability of nano emulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.* 108–109, 303–318.
- Tangsuphoom, N., & Coupland, J.N. (2008). Effect of pH and ionic strength on the physicochemical properties of coconut milk emulsions. *J. Food Sci.* 73, 274–280.
- Tay, S.T., Xu, G.Q., Perera, C.O. (2005). Aggregation profile of 11S, 7S and 2S coagulated with GDL. *Food Chem.* 91, 457–462.
- Taylor, P., (1995). Ostwald ripening in emulsions. *Colloids Surf. A*, 99, 175–185
- Thrane, M., Paulsen, P.V., Orcutt, M.W., Krieger, T.M. (2016). Soy protein: Impacts, production, and applications. In S. R. Nadathur, J. P. D. Wanasundara, & L. Scanlin (Eds.). *Sustainable protein sources*, pp. 23–45.
- Tiab, D., & Donaldson, E.C. (2004). Tensiones superficiales e interfaciales. *Petrofísica*, 841–845.
- Troncoso, E., Aguilera, J.M., McClements, D.J., (2012). Fabrication, characterization and lipase digestibility of food-grade nano emulsions. *Food Hydrocoll.* 27, 355–363.
- Turgeon, S. L., Schmitt, C., and Sanchez, C. (2007). Protein polysaccharide complexes and coacervates. *Curr. Opin. Colloid Interface* 12, 166–178.
- Vaccaro, J. (2016). Polisacaridos insolubles de soja: aplicación en el desarrollo de emulsiones alimentarias. Tesina de grado. Universidad Nacional de Quilmes.
- van Boekel, M.A.J.S. & Walstra, P. (1981). Stability of oil-in-water emulsions with crystals in the disperse phase. *Colloids Surf.* 3, 109–118
- van der Riet, W.B., Wight, A.W., Cilliers, J.J., Dattel, J.M. (1989). Food chemical investigation of tofu and its byproduct okara. *Food Chem.* 34, 193–202.
- van Nieuwenhuyzen, W., Szuhaj, B. (1998). Effect of lecithins and proteins on the stability of emulsions. *Fett-Lipid* 10, 282–291.
- Velikov, K.P., & Pelan, E. (2008). Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals. *Soft Matter* 4 (10), 1964–1980.
- Vieira, C. R., Biasutti, E.A.B., Capobianco, M., Afonso, W.O., Silvestre, M.P.C. (2006). Efectos de la sal sobre la solubilidad y las propiedades emulsionantes de la caseína y sus hidrolizados tripticos. *Ars Pharmaceutica* 47, 281–292.
- Wagner, J. R., & Guéguen, J. (1995). Effects of dissociation, deamidation, and reducing treatment on structural and surface active properties of soy glycinin. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1993–2000
- Wagner, J. R., & Guéguen, J. (1999). Surface Functional Properties of Native, Acid-Treated, and Reduced Soy Glycinin. 2. Emulsifying Properties. *J. Agric. Food Chem.* 47, 2181–2187.
- Walstra, P. (1983). Formation of emulsions in *Encyclopedia of emulsion technology*. Vol. 1: Basic theory. Becher, P. (ed). New York: Marcel Dekker, Inc. páginas 57–127.

- Walstra, P. (1993). Principles of emulsion formation. *Chem. Eng. Sci.* 48, 333–349.
- Walstra, P. (1996a). Emulsion stability, in *Encyclopedia of Emulsion Technology*, Vol. 4, Becher, P., Ed., Marcel Dekker, New York, , chap. 1.
- Walstra, P., (1996b). Disperse systems: Basic considerations, in *FoodChemistry*, 3rd ed., Fennema, O.R., Ed., Marcel Dekker, New York, chap. 3.
- Walstra, P. (2003). *Physical Chemistry of Foods*. Marcel Decker, New York, NY.
- Walstra, P. & van Beresteyn, E.C.H., (1975). Crystallization of milk fat in the emulsified state. *Neth. Milk Dairy J.*, 29, 35.
- Wang, X.-S., Tang, C.-H., Li, B.-S. et al. (2008). Effects of high pressure treatment on some physicochemical and functional properties of soy protein isolates. *Food Hydrocoll.* 22, 560–567.
- Wang, K., Li, G., & Zhang, B. (2018). Opposite results of emulsion stability evaluated by the TSI and the phase separation proportion. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 558, 402–409.
- Wooster, T., Golding, M., Sanguansri, P.(2008). Impact of oil type on nano emulsion formation and Ostwald ripening stability. *Langmuir* 24 (22), 12758–12765.
- Yeom, K.-H., Schonewille, J.T., Everts, H., Zoet, J.M., Beynen, A.C. (2003). Impact of dietary soybean oil versus medium-chain triglycerides on plasma fatty acids in goats. *Small Rumin. Res.* 48(3), 201–208.
- Yin, Chu, Kobayashi, N. (2008). Performance of selected emulsifiers and their combinations in the preparation of beta-carotene nano dispersions. In: 9th International hydro colloids conference. Singapore.
- Yin, L.J., Chu, B.S., Kobayashi, I., Nakajima, M. (2009). Performance of selected emulsifiers and their combinations in the preparation of beta-carotene nano dispersions. *FoodHydrocoll.* 23, 1617–1622.
- Yoshi, H. Furuta, T. Maeda, H. Mori, H. (1996). Hydrolysis kinetics of okara and characterization of its water-soluble polysaccharides, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60(9), 1406-1409.
- Youle, R.J., Huang, A.H.C. (1981). Occurrence of low-molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oil seeds of diverse species. *Am. J. Bot.* 68, 44 – 48.
- Zhang, Y., Zhao, W., Yang, R., Ahmed, M. A., Hua, X., Zhang, W., Zhang, Y. (2013). Preparatio and functional properties of protein from heat-denatured soybean meal assisted by steam explosion with dilute acid soaking. *J. Food Eng.* 119, 56–64.
- Zhang, J., Liang, L., Tian, Z., Chen, L., Subirade, M. (2012). Preparation and in vitro evaluation of calcium-induced soy protein isolate nanoparticles and their formation mechanism study. *Food Chem.* 133, 390-399.
- Zhao, X., Chen, F., Xue, W., & Lee, L. (2008). FTIR spectra studies on the secondary structures of 7S and 11S globulins from soybean proteins using AOT reverse micellar extraction. *FoodHydrocoll.* 22(4), 568–575.
- Zalua, Rodríguez-Riera, Malvis, Robaina-Mesa, Jáuregui-Haza, U., BlancoGonzález, A., Rodríguez, E., Chanfrau, J. (2014). Empleo de la radiación ultrasónica para la

extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectivas. Revista CENIC Ciencias Químicas, 45, 139-144.

Anexo I. Constantes reológicas del modelo de Herschel Bulkley (τ_0 : umbral de fluencia, K : índice de consistencia y n : índice de comportamiento de flujo para las emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas de S-OK (4 % m/m) y fracciones ISPS, S-ISPS y ISPS-S (2 % m/m) a pH 3,0.

pH 3,0						
	dia 1			dia 28		
	S-OK	S-OK _{Ca}	S-OK _{Na}	S-OK	S-OK _{Ca}	S-OK _{Na}
τ_0	0.1039	0.0734	0.0668	0.0792	0.0780	0.0706
k	0.0674	0.1001	0.0780	0.0338	0.0511	0.0360
n	0.6830	0.6447	0.6729	0.7330	0.7353	0.7437
	ISPS	ISPS _{Ca}	ISPS _{Na}	ISPS	ISPS _{Ca}	ISPS _{Na}
τ_0	0.4002	0.4063	0.3225	0.3312	0.5639	0.5445
k	0.4150	0.4242	0.5348	0.3895	0.4435	0.3002
n	0.4370	0.4751	0.4148	0.5464	0.5466	0.5819
	S-ISPS	S-ISPS _{Ca}	S-ISPS _{Na}	S-ISPS	S-ISPS _{Ca}	S-ISPS _{Na}
τ_0	0.3414	0.2646	0.2762	0.9443	0.5214	0.6594
k	0.3019	0.0965	0.1488	1.0570	0.2932	0.7840
n	0.4644	0.5252	0.5195	0.3710	0.4880	0.3750
	ISPS-S	ISPS-S _{Ca}	ISPS-S _{Na}	ISPS-S	ISPS-S _{Ca}	ISPS-S _{Na}
τ_0	0.5608	0.5255	0.6691	0.7979	0.5764	0.8012
k	0.5423	0.5074	0.3845	0.2691	0.3262	0.2450
n	0.4272	0.4580	0.5273	0.6414	0.6121	0.6885

Nota. Constantes reológicas obtenidas por medio del modelo de Herschell Bulkle

Anexo 2. Constantes reológicas del modelo de Herschel Bulkley (τ_0 : umbral de fluencia, K : índice de consistencia y n : índice de comportamiento de flujo para las emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas de S-OK (4 % m/m) y fracciones ISPS, S-ISPS y ISPS-S (2 % m/m) a pH 4,5.

pH 4,5						
	dia 1			dia 28		
	S-OK	S-OK _{Ca}	S-OK _{Na}	S-OK	S-OK _{Ca}	S-OK _{Na}
τ_0	0.4009	0.3414	0.4214	0.1974	0.448	0.2632
k	0.1616	0.2451	0.1223	0.1571	0.2277	0.1589
n	0.5946	0.5558	0.6264	0.4421	0.608	0.4447
	ISPS	ISPS _{Ca}	ISPS _{Na}	ISPS	ISPS _{Ca}	ISPS _{Na}
τ_0	0.3515	0.2451	0.3795	0.5102	0.4114	0.4421
k	0.4049	0.3873	0.3294	0.2776	0.5091	0.3639
n	0.4694	0.4368	0.4808	0.597	0.5724	0.5759
	S-ISPS	S-ISPS _{Ca}	S-ISPS _{Na}	S-ISPS	S-ISPS _{Ca}	S-ISPS _{Na}
τ_0	0.3473	0.2262	0.3461	0.3842	0.2147	0.3346
k	0.2480	0.3301	0.2547	0.1313	0.4668	0.2726
n	0.4598	0.4108	0.4944	0.5732	0.5175	0.5368
	ISPS-S	ISPS-S _{Ca}	ISPS-S _{Na}	ISPS-S	ISPS-S _{Ca}	ISPS-S _{Na}
τ_0	0.7087	0.5392	0.5064	0.8087	0.7078	0.7305
k	0.3185	0.2338	0.3402	0.2037	0.1787	0.2127
n	0.5679	0.6150	0.5085	0.7285	0.7439	0.7151

Nota. Nota. Constantes reológicas obtenidas por medio del modelo de Herschell Bulkley. .