Solubilidad de la proteína de soya aislada tratada con alcalasa a pH ácido y sus propiedades funcionales

Mariela Sarai Serrano Vallecios

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2015

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Solubilidad de la proteína de soya aislada tratada con alcalasa a pH ácido y sus propiedades funcionales

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Mariela Sarai Serrano Vallecios

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2015

Solubilidad de la proteína de soya aislada tratada con alcalasa a pH ácido y sus propiedades funcionales

Presentado por:

Mariela Sarai Serrano Vallecios

Aprobado:

_____
Raúl Espinal, Ph.D.
Asesor Principal

_____
Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria Alimentaria

_____
Juan Antonio Ruano, D.Sc.
Asesor

_____
Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Solubilidad de la proteína de soya aislada tratada con alcalasa a pH ácido y sus propiedades funcionales

Mariela Sarai Serrano Vallecios

Resumen: La proteína de soya tiene poca solubilidad en pH ácido cerca de su punto isoeléctrico, lo cual es indispensable para su utilización en bebidas. El objetivo de este estudio fue determinar y aumentar la solubilidad de la proteína de soya a pH ácidos a través de hidrólisis enzimática y determinar sus propiedades funcionales como emulsionante y espumante para su posible utilización en bebidas. Se hidrolizó la proteína haciendo uso de la enzima alcalasa a diferentes concentraciones (0.0001, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.10, 1.5 y 2.00 AU/g de proteína). Los resultados fueron analizados a través de un ANDEVA y separación de medias ajustadas LSMEANS. La máxima solubilidad de 74.9% fue observada a pH 3.0 con un grado de hidrólisis de 9.2%, cuando la proteína fue tratada con una concentración enzimática de 1.5 AU/g de proteína. La mayor actividad emulsionante a pH 3.0 y 4.0 fue de 0.63 y 0.24, respectivamente. Mientras que la mayor estabilidad emulsionante a los mismos valores de pH fue de 14.7 y 56.0 min respectivamente. La mayor capacidad de formación de espuma a pH 3.0 y 4.0 fue de 46.3 y 41.3 ml respectivamente y la mayor estabilidad espumante obtenida a los mismos valores de pH fue de 35.2 y 15.1 min respectivamente. Basándose en los resultados obtenidos, la proteína de soya aislada tratada con alcalasa puede ser un método apropiado para obtener una mejor solubilidad a pH cercanos a su punto isoeléctrico y ser usada en la elaboración de bebidas con alto contenido de proteína.

Palabras clave: actividad emulsionante, capacidad espumante, estabilidad emulsionante, estabilidad espumante, hidrólisis.

Abstract: Soy protein lacks solubility in acidic pH near its isoelectric point and this is required for its use in beverages. The aim of this study was to increase the solubility of soy protein isolate at acidic pH by enzymatic hydrolysis and determine its solubility and functional properties such as emulsifying and foaming for possible use in drinks. Soy protein isolate was hydrolyzed using alcalase at different concentrations (0.0001, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.10, 1.5 y 2.00 AU/g of protein). The results were analyzed using ANDEVA and adjusted means separation LSMEANS. Maximum solubility of 74.9% was observed at a pH of 3.0 at 9.2% degree of hydrolysis, when the protein was treated with an enzyme concentration of 1.5 AU / g protein. The higher emulsifying activity at pH 3.0 and 4.0 was 0.63 and 0.24, respectively, while the highest emulsion stability at the same pH was 14.7 and 56.0 min respectively. The higher foaming capacity at pH 3.0 and 4.0 was 46.3 and 41.3 mL respectively and higher foaming stability was 35.2 and 15.1 mL respectively. Based on the results obtained, soy protein isolate treated with alcalase may be a promising method to obtain a better solubility at pH close to their isoelectric point and can be used in the preparation of high protein beverages.

Keywords: Emulsifying activity, emulsifying stability, foaming capacity, foaming stability, hydrolysis.

CONTENIDO

Portadilla i
Página de firmas ii
Resumen iii
Contenido iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos v

1. INTRODUCCIÓN 1

2. MATERIALES Y MÉTODOS 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 7

4. CONCLUSIONES 15

5. RECOMENDACIONES 16

6. LITERATURA CITADA 17

7. ANEXOS 21

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros Página

1. Tratamientos para la evaluación de la solubilidad y grado de hidrólisis..... 3
2. Grado de hidrólisis (%) de la proteína de soya hidrolizada a diferentes concentraciones de alcalasa a pH 3.0, 3.5 y 4.0 7
3. Solubilidad (%) de la proteína de soya aislada hidrolizada a diferentes concentraciones de alcalasa a pH 3.0, 3.5 y 4.0. 10
4. Actividad emulsionante (ABS) de proteína de soya hidrolizada con diferentes concentraciones de alcalasa a pH 3.0 y 4.0 11
5. Estabilidad emulsionante (min) de proteína de soya aislada hidrolizada con diferentes concentraciones de alcalasa a pH 3.0 y 4.0 11
6. Capacidad espumante (ml) de proteína de soya aislada hidrolizada con diferentes concentraciones de alcalasa a pH 3.0 y 4.0 13
7. Estabilidad espumante (ml) de proteína de soya aislada hidrolizada con diferentes concentraciones de alcalasa a pH 3.0 y 4.0 13

Figuras Página

1. Solubilidad de la proteína de soya aislada..... 9

Anexos Página

1. Diagrama de flujo para la preparación de proteína de soya hidrolizada 21

1. INTRODUCCIÓN

La soya (*Glycine max*) es una planta leguminosa nativa de Asia Oriental. En Estados Unidos, la soya ha sido utilizada principalmente para producir aceite y para alimentar el ganado. Sin embargo, en la última década se ha convertido en un cultivo importante en la industria de alimentos para consumo humano (Chen *et al*., 2011). De acuerdo con los datos de la FAO, el país con la mayor producción de este cultivo en 2014 fue los EE.UU. contribuyendo en un 34.3% de la producción mundial (FAO, 2015).

El contenido proteico de la soya es de aproximadamente 40% en base seca (Nishinari *et al.*, 2014). Este porcentaje se conforma de globulinas y albuminas, donde las globulinas son predominantes (Söderberg, 2013), contribuyendo entre un 65-80% de la proteína total (Lee, 2011). En base a su coeficiente de sedimentación, la glicina y la β - conglicinina se clasifican como 11S y 7S, respectivamente (Wang y de Mejía, 2005). Debido a su elevado contenido de proteínas y otros fitoquímicos beneficiosos para la salud, la proteína de soya está siendo considerada como ingrediente importante en productos con alto valor proteico para el consumo humano.

La proteína nativa de la soya carece de funcionalidad (Chove *et al.*, 2001). La solubilidad es un pre-requisito para las demás propiedades funcionales, y es una de las propiedades más importantes aplicada en bebidas de alto contenido proteico (Lee, 2011). Debido a que las bebidas ácidas son relativamente claras, las proteínas deben permanecer solubles para poder encontrarse en ellas (Beecher *et al.*, 2008). Sin embargo, la proteína de soya aislada tiene poca solubilidad a pH ácidos; baja solubilidad alrededor de pH 3.5 a 5.5 ha sido reportada por Horax *et al.* (2004a), Jung *et al*. (2005) y Nishinari *et al.* (2014). Por lo que la solubilidad de la proteína de soya aislada afecta la calidad de las bebidas (Lee, 2011).

La hidrólisis enzimática es un procedimiento utilizado en la industria alimentaria para generar péptidos pequeños a partir de las proteínas, con el objetivo de mejorar las propiedades funcionales y características nutricionales (Wang y de Mejía, 2005). La enzima comúnmente utilizada es alcalasa, ya que ha sido reportada como una proteasa eficiente para la hidrólisis de proteínas vegetales (Gao y Zhao, 2012). La hidrólisis enzimática de la proteína de soya aislada, modificada por pancreatina o alcalasa, con un aumento en su solubilidad ha sido reportada por Qi *et al.* (1997) y Ortiz y Wagner (2002).

Actividad emulsionante y capacidad de formación de espuma son algunas de las propiedades funcionales más importantes de proteínas para su uso en productos alimenticios (Horax *et al.*, 2004b). La hidrólisis de proteína causa cambios en el tamaño molecular, la solubilidad y la exposición de grupos hidrofóbicos influyendo en las propiedades de emulsión y capacidad espumante de una proteína (Panyam y Kilara,

1996). De acuerdo a Ortiz y Wagner (2002) se ha determinado que a pH 4.5 la proteína de soya aislada tiene una baja capacidad de formación y estabilidad de espuma. La hidrólisis enzimática mejora la capacidad espumante de productos de soya a diferentes pH (Jung *et al*., 2004; Ortiz y Wagner, 2002).

Existen estudios que han evaluado las propiedades emulsionantes de la proteína de soya aislada a diferentes pH y encontraron que la actividad y estabilidad de emulsión más pobre era a pH cercanos al punto isoeléctrico de la proteína (pH 4.0 a 5.5); los bajos niveles de fracciones de globulina son responsables de baja propiedad emulsionante a ese pH (Qi *et al.,* 1997; Chove *et al.,* 2001). Hidrolizar proteína de soya utilizando una enzima puede cambiar la distribución de fracciones de proteína que contribuyen a la alteración de la funcionalidad de la solución de proteína a diversos pH.

Las propiedades funcionales de la proteína de soya pueden verse afectadas, aún más, cerca de su punto isoeléctrico, así como también en la mayoría de alimentos y bebidas ácidas. La incapacidad de la proteína para satisfacer una funcionalidad particular requerida en un alimento a pH ácido puede limitar su uso, así como la baja solubilidad de ésta impide su aplicación en bebidas. La modificación enzimática controlada de la proteína de soya a pH específicos puede mejorar algunas de sus funcionalidades, incluyendo la solubilidad, actividad espumante y capacidad emulsionante, mediante la reducción de los tamaños moleculares de la proteína o aumentando la adhesión de las proteínas a la interfaz (Ipsen *et al.,* 2001; Govindaraju y Srinivas, 2006; Radha y Prakash, 2009; Tsumura, 2009; Chen *et al.,* 2014).

Sin embargo, la modificación enzimática puede alterar otras funcionalidades, como la estabilidad de espuma y de emulsión, de manera desfavorable (Panyam y Kilara, 1996; Chove *et al.,* 2001; Lam y Nickerson, 2013; Nishinari *et al.,* 2014). Existe información limitada y contradictoria sobre la solubilidad y las propiedades funcionales de la modificación enzimática de la proteína de soya aislada a pH ácido. Por tanto, en este estudio los objetivos planteados fueron:

- Aumentar la solubilidad de la proteína de soya aislada a pH ácido a través de hidrólisis enzimática.

- Evaluar el efecto en las propiedades emulsionantes y espumantes de la proteína de soya hidrolizada con alcalasa en su punto isoeléctrico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue realizado en el departamento de Ciencia de Alimentos de la Universidad de Arkansas, Estados Unidos.

Preparación de proteína de soya hidrolizada. La proteína de soya aislada (PSA) fue diluida en agua des-ionizada para obtener una solución madre de PSA al 2%. La solución madre fue distribuida en nueve tubos de ensayo y luego se les añadió ácido clorhídrico 1 N para ajustar a un pH específico. La hidrólisis de la PSA se condujo a pH ácido de 3.0, 3.5 o 4.0 haciendo uso de la enzima alcalasa (2.4L). Ocho concentraciones de enzima (0.0001, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.10, 1.5 y 2.00 AU/g de proteína) fueron añadidas para obtener proteína de soya hidrolizada. Inmediatamente después de la adición de la enzima, los tubos de ensayo con la solución fueron incubados mientras eran agitados a 120 rpm durante tres horas a 60 °C en baño maría en una incubadora (Grant Model OLS200, Cambridge, Inglaterra). Finalizado el tiempo de incubación, los tratamientos fueron calentados a 85 °C por 5 min para inactivar la enzima y enfriados a temperatura ambiente. Luego los tratamientos fueron evaluados para medir su grado de hidrólisis, solubilidad y propiedades funcionales.

Cuadro 1. Tratamientos para la evaluación de solubilidad y grado de hidrólisis.

Concentración de enzima (AU/g de proteína)	pH		
	3.0	3.5	4.0
0.0001	TRT 1	TRT 2	TRT 3
0.001	TRT 4	TRT 5	TRT 6
0.005	TRT 7	TRT 8	TRT 9
0.01	TRT 10	TRT 11	TRT 12
0.05	TRT 13	TRT 14	TRT 15
0.10	TRT 16	TRT 17	TRT 18
1.50	TRT 19	TRT 20	TRT 21
2.00	TRT 22	TRT 23	TRT 24

Determinación de grado de Hidrólisis. El método de Nielsen *et al.*, (2001) fue utilizado con algunas modificaciones para determinar el grado de hidrólisis (GH). Una solución de serina (seleccionada como el estándar), fue preparada disolviendo serina en agua

desionizada para hacer una solución de serina al 0.1%. El reactivo orto-ftaldehído (OPA) se preparó pesando 250 mg de sulfato de sodio dodecil y 9.525 g de decahidratado de di-sodio-tetraborato y fueron diluidos en 155 ml de agua, luego 200 mg de orto-ftaldialdehído 97% se pesaron y se disolvieron en 5 ml de etanol. Ambas soluciones se disolvieron completamente antes de mezclarlas. Posteriormente, 200 mg de ditiotreitol 99% fueron pesados y añadidos a la mezcla. Por último se añadió agua des-ionizada para obtener un volumen total de 250 mL. Todos los tratamientos se diluyeron 20 veces con el fin de obtener una concentración de proteína adecuada para ser leída por el espectrofotómetro. Cuatrocientos µL fueron tomados de cada tratamiento diluido y se colocaron en tubos de ensayo, se añadió 3 ml de reactivo OPA a cada tratamiento y se mezclaron. El blanco se preparó utilizando 400 µL de agua des-ionizada y el estándar utilizando 400 µL de solución de serina al 0.1% en lugar de la solución de PSA. La absorbancia del blanco fue utilizada para la calibración del espectrofotómetro. Posteriormente se leyó la absorbancia de cada tratamiento y por último la del estándar. La absorbancia del blanco, del estándar y de cada tratamiento fue leída exactamente dos minutos después de la adición del reactivo OPA. Todas las lecturas de absorbancia se realizaron a 340 nm utilizando el espectrofotómetro (Modelo Shimadzu UV-1601, Kyoto, Japón). El GH fue calculado a través de las siguientes ecuaciones:

$$(Serina - NH_2) = \frac{Muestra_{ABS} - Blanco_{ABS}}{Estándar_{ABS} - Blanco_{ABS}} \; x \; \frac{(0.9516 \; x \; V \; x \; 100)}{(X \; x \; P)} \qquad [1]$$

Donde V es el volumen de la muestra en litros, X es el peso de la muestra en gramos, P es el contenido de proteína en la muestra expresado en porcentaje, y Serina–NH_2 es meq Serina-NH_2/g proteína.

$$h = \frac{(Serina - NH_2) - \beta}{\alpha} \qquad [2]$$

Donde h representa el número de enlaces hidrolizados y los valores α y β para proteína de soya son 0.970 y 0.342 respectivamente.

$$GH = \frac{h}{h_{tot}} \; x \; 100 \qquad [3]$$

Donde h_{tot} para proteína de soya es 7.8, que es el total de enlaces peptídicos por equivalente de proteína.

Determinación de solubilidad de la PSA hidrolizada. La solubilidad de la proteína fue determinada usando el método desarrollado por Bera y Mukherjee (1989) con algunas modificaciones. Un mililitro de la solución de PSA tratada con la enzima alcalasa, de cada tratamiento se centrifugó a 1,000 rpm durante 10 minutos para obtener un sobrenadante conteniendo la proteína soluble. El contenido de proteína soluble en los sobrenadantes y la proteína total de las soluciones se determinaron utilizando el reactivo Biuret basado en el método de Lowry *et al.* (1951). Para determinar el contenido de proteína, 0.2 ml de la solución de PSA 20 veces diluida de cada tratamiento, fueron colocados en tubos de ensayo, luego se les añadió 2.2 ml de reactivo de Biuret, se mezclaron en vórtex luego de la adición y se dejaron reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente

se añadió 0.1 ml de reactivo de Folin y Ciocalteu's fenol a cada tratamiento, se mezcló en el vórtex, y se dejó reposar durante 30 minutos antes de la lectura de la absorbancia. El espectrofotómetro fue utilizado para leer la absorbancia a una longitud de onda de 720 nm. El porcentaje de solubilidad de proteína de cada tratamiento se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$PS\ (\%) = \frac{ABSs}{ABSt}\ x\ 100 \qquad [4]$$

Donde ABSs es la absorbancia de la proteína soluble en el sobrenadante y ABSt es la absorbancia de la proteína total en las soluciones. La solubilidad de la proteína de soya aislada no tratada con alcalasa se determinó a valores de pH que oscilan desde 2.0 hasta 10.0 para comparación.

Determinación de las propiedades emulsionantes. Proteína de soya aislada tratada con alcalasa a dos valores de pH (3.0 y 4.0) y tres concentraciones de enzima fueron seleccionados, en base al menor (0.0001 y 0.005 AU / g de proteína) y mayor GH y solubilidad (1.5 AU/ g de proteína), para evaluar sus propiedades como emulsionantes y espumantes. La estabilidad de la emulsión (ES) y la actividad emulsionante (EA) se evaluaron mediante una técnica turbidimetrica modificada descrita por Pearce y Kinsella (1978). Cada tratamiento seleccionado fue diluido en 10 mM de buffer de fosfato a pH 7.0 para obtener soluciones de PSA al 0.1%. Dos mililitros de aceite de maíz y seis ml de solución de PSA al 0.1% de cada tratamiento, se mezclaron y se homogenizaron durante un minuto utilizando un sonicador (Virtishear Tempest, The Virtis Co., Gardiner, Nueva York, Estados Unidos) en nivel seis. Cincuenta microlitros de la mezcla homogenizada fueron añadidos a 5 ml de solución al 0.1% de dodecil sulfato de sodio (DSS) en agua desionizada para determinar la actividad emulsionante (EA). Después de 10 minutos, 50 µL fueron agregados a 5 ml de solución al 0.1% de DSS en agua desinozada para determinar la estabilidad de la emulsión (ES) La turbidez se midió utilizando el espectrofotómetro a una longitud de onda de 500 nm a 0 y 10 minutos después de la homogenización de cada tratamiento. La EA se expresó como la turbidez (T) a cero minutos (inmediatamente después de la homogenización) y la ES se calculó utilizando la ecuación 5.

$$ES = \ T_O\ x\ \frac{\Delta t}{\Delta T} \qquad [5]$$

Donde ΔT es la disminución de la turbidez de T_O que se produjo en un intervalo de 10 minutos (Δt).

Determinación de las propiedades espumantes. El método de Kato *et al.* (1983) se utilizó para determinar la capacidad de formación de espuma (FC) y la estabilidad de la espuma formada (FS) de la solución de PSA hidrolizada. Cinco mililitros de solución PSA al 1.0% de cada tratamiento fueron añadidos en 0.05 M de buffer de fosfato a pH 7.4 y colocados en tubos volumétricos. Aire a presión de 200 cm^3/min se inyectó en cada tubo durante 15 segundos para generar espuma. El volumen de la espuma se midió inmediatamente después de introducir el aire (0 min) y 10 min después de la inyección de aire. El volumen en el tiempo 0 era el FC (en ml) de la solución de PSA hidrolizada y FS se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$FS = V_o \; x \; \frac{\Delta t}{\Delta V} \qquad [6]$$

Donde V_o es el volumen a 0 min, Δt el intervalo de tiempo y ΔV es la disminución en el volumen de espuma después de 10 min de la introducción de aire en cada tubo.

Diseño experimental y análisis estadístico. Se usó un diseño DCA con tres repeticiones para evaluar los tratamientos (Cuadro 1). Los datos obtenidos fueron analizados a través de un análisis de varianza para evaluar la significancia del modelo y una separación de medias DUNCAN y LSMEANS para comparar las medias de tres repeticiones y encontrar diferencias significativas al 5% de significancia.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Grado de hidrolisis de PSA. El grado de hidrólisis de la proteína de soya aislada tratada con alcalasa es utilizado en muchos casos, como una herramienta para relacionar los cambios ocurridos en la solubilidad de la proteína. En base a los resultados (Cuadro 2), se determinó que los hidrolizados de proteína de soya a pH 3.0 y 3.5 se consideran con bajo grado de hidrólisis, ya que se encuentran entre 1 - 10% (Benítez *et al.,* 2008). Según estudios, se requiere un bajo grado de hidrólisis controlado y limitado, con el fin de obtener un mejoramiento en las propiedades funcionales de la proteína (Lee, 2011; Tsumura, 2005; Villanueva *et al.,* 1999). Sin embargo a pH 4.0 solamente los hidrolizados con concentración de alcalasa de 1.5 y 2.0 AU/g de proteína entran en la categoría, por lo que se puede asumir que a este pH, las propiedades funcionales no hayan sido mejoradas significativamente. Aun así, incrementos en las propiedades funcionales de proteína de soya con bajo grado de hidrólisis han sido demostrados a pH de 4.0 (Achouri *et al.,* 1998).

Cuadro 2. Grado de hidrólisis (%) de la proteína de soya hidrolizada a diferentes concentraciones de alcalasa a pH 3.0, 3.5 y 4.0. [1]

Grado de Hidrólisis			
Concentración de alcalasa (AU/g proteína)	pH		
	3.0	3.5	4.0
0.0001	5.3 ± 3.5 ^{Ba}	2.3 ± 1.8 ^{Bb}	0.0 ± 0.0 ^{Bb}
0.001	5.0 ± 2.6 ^{Ba}	2.5 ± 1.7 ^{Bb}	0.0 ± 0.0 ^{Bc}
0.005	5.5 ± 2.5 ^{Ba}	2.8 ± 1.7 ^{Bb}	0.0 ± 0.0 ^{Bc}
0.01	5.7 ± 3.0 ^{Ba}	3.1 ± 3.0 ^{Bb}	0.0 ± 0.0 ^{Bc}
0.05	5.9 ± 1.9 ^{Ba}	2.2 ± 2.3 ^{Bb}	0.0 ± 0.0 ^{Bb}
0.10	6.2 ± 2.6 ^{Ba}	2.3 ± 2.1 ^{Bb}	0.0 ± 0.0 ^{Bb}
1.50	9.2 ± 3.3 ^{Aa}	5.4 ± 2.8 ^{Ab}	3.0 ± 0.3 ^{Ab}
2.00	10.7 ± 1.0 ^{Aa}	6.1 ± 3.0 ^{Ab}	5.4 ± 0.2 ^{Ab}
% CV		37.8621	

[1] Los valores con letras mayúsculas diferentes en la misma columna y los valores con minúsculas diferentes en la misma fila son significativamente diferentes entre sí ($P<0.05$).

Uno de varios problemas que pueden ocasionarse al momento de hidrolizar la proteína de soya aislada es la amargura en su sabor (Adler-Nissen, 1979). Esta amargura se debe a la formación de péptidos de bajo peso molecular, compuestos principalmente de aminoácidos hidrofóbicos (Barac *et al.*, 2004). La amargura limita su uso en los alimentos, no obstante, la mayoría de valores de grado de hidrólisis se encontraron dentro del rango.

Temperatura, pH, relación enzima-sustrato y el tiempo de reacción son variables que influyen en el grado de hidrólisis (Rubio *et al.*, 1993; Adler-Nissen, 1979; Panyam y Kilara, 1996). Como se detalla en el Cuadro 1, cada nivel de concentración de alcalasa a pH 3.0 es estadísticamente diferente a pH 3.5 y 4.0, presentando un mayor grado de hidrólisis. Esto indica que la enzima trabajó mejor a pH 3.0 afectando de manera significativa la hidrólisis de la proteína comparado con los demás pH.

Sin embargo, el pH óptimo para la enzima alcalasa es de 6.5 a 8.5 (Villanueva *et al.*, 1999). La mayoría de estudios realizados en la hidrólisis de proteínas con alcalasa, han sido desarrollados a pH óptimos (Lee, 2011). Los resultados muestran que la enzima alcalasa es capaz de hidrolizar la proteína, en condiciones ácidas por debajo del pH óptimo, para formar moléculas de péptidos más pequeños.

Se han reportado un grado de hidrólisis de 6% en proteína de soya hidrolizada con alcalasa, a un rango de pH entre 4.0 y 5.0, con una concentración de 0.24 AU-A, presentando además un incremento en solubilidad (Panyam y Kilara, 1996). Un grado de hidrólisis de 38.56% de proteína de soya aislada a pH 8.0 fue reportado por Nielsen *et al.* (2001). Asimismo, se han reportado diferentes grados de hidrólisis controlada a pH 4.0 en proteína aislada de soya, hidrolizada con la enzima bromelina (Ortiz *et al.*, 2002).

Como se observó en los resultados, el grado de hidrólisis aumentó a medida que la concentración de alcalasa en la proteína de soya también aumentaba. Además se observó que a los tres diferentes valores de pH a los cuales se hidrolizó, no hubo diferencia estadística en el grado de hidrólisis a concentraciones de alcalasa de 1.5 y 2.0 AU/g de proteína. Patrones similares fueron reportados por Liceaga-Gesualdo y Li-Chan (1999) en la hidrólisis de proteína de pescado con alcalasa a igual temperatura de incubación (60°C) pero a pH de 8.0.

Solubilidad de la PSA hidrolizada. La hidrólisis de proteína permite la formación de péptidos de pequeño tamaño molecular, aumentando la solubilidad. Según Panyam y Kilara (1996) la solubilidad también puede estar relacionada con el aumento de moléculas de polipéptido con cargas expuestas. Las características de solubilidad se ven afectadas termodinámicamente por el balance entre las interacciones proteína-proteína y proteína-solvente (Horax, 2014a). La interacción iónica entre la proteína y el agua, resulta en un aumento de la solubilidad de la proteína. La proteína de soya tiene su punto isoeléctrico cerca de pH 4.0, donde la proteína llega a una coalescencia máxima de proteínas, alcanzando su menor solubilidad (Benítez *et al.*, 2008). Debido a las condiciones de pH, las interacciones proteína-agua que pueden encontrarse son mínimas, causando la precipitación de la proteína.

El perfil de solubilidad de la proteína de soya aislada, no hidrolizada, a diferentes valores de pH, se muestra en la Figura 1. La proteína tiene su mayor solubilidad (>80%) en pH alcalino que va desde 6.0 a 10.0, así como también a pH 2.0. La solubilidad más baja (<20%) se observa a pH ácidos de 3.5 a 5.0. Resultados similares han sido reportados en otros estudios en los que la proteína de soya aislada presenta baja solubilidad (<10%) a pH de 3.5 a 5.0 (Horax *et al.*, 2004a; Jung *et al.*, 2005; Nishinari *et al.*, 2014).

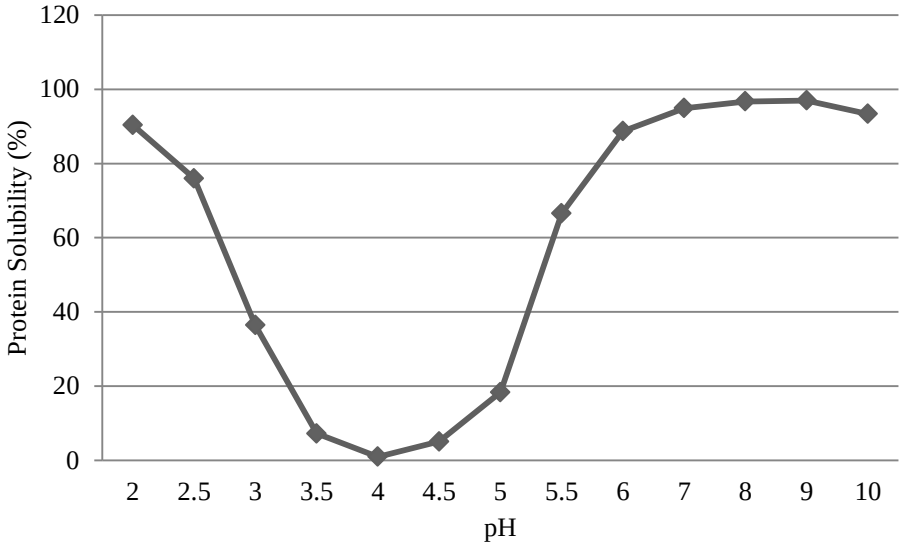


Figura 1. Solubilidad de la proteína de soya aislada.

La mejora más evidente en la funcionalidad de una proteína como resultado de la hidrólisis parcial es el aumento en la solubilidad (Panyam y Kilara, 1996). Valores de la solubilidad de la proteína de soya aislada, hidrolizada con alcalasa, se muestran en el Cuadro 3. La proteína de soya hidrolizada enzimáticamente, posee un incremento en la solubilidad general a los tres valores de pH, al compararlos con la proteína de soya aislada no hidrolizada (Figura 1). Aumento en la solubilidad de la proteína de soya aislada, con hidrólisis enzimática, también ha sido reportada por Qi *et al.* (1997) y Ortiz y Wagner (2002).

Por lo tanto, la hidrólisis enzimática de la proteína de soya es un tratamiento favorable para su uso en productos alimenticios donde la solubilidad es un requerimiento. Resultados confirman la aplicación de proteasas como una alternativa útil para aumentar la solubilidad de la proteína nativa del aislado de soya (Adler-Nissen, 1979). En especial el uso de alcalasa, que ha demostrado la solubilidad más alta en proteína de soya aislada, al compararla con otras proteasas en las mismas condiciones a pH neutros (Lee, 2011).

Solubilidad de la proteína de soya hidrolizada se determinó a pH ácido con el objetivo de evaluar su solubilidad a los pH de alimentos ácidos. La solubilidades de la proteína con todas las concentraciones de alcalasa a pH 3.0, 3.5 y 4.0 oscilaron entre 70.7 – 74.9%, 18.8 – 51.2% y 7.1 – 40.4%, respectivamente (Cuadro 3). La proteína de soya hidrolizada

(obtenida de una concentración de alcalasa de 1.5 y 2.0 AU/ g de proteína) mostraron un aumento en la solubilidad particularmente a pH 3.5 y 4.0 en comparación con la proteína de soya sin hidrólisis como se muestra en la Figura 2.

La proteína de soya hidrolizada a pH 3.0 con una concentración enzimática de 1.5 AU/ g de proteína, alcanzó la solubilidad más alta (74.9%), mientras que la solubilidad más baja (70.7%) a igual pH fue obtenida utilizando 0.01 AU/ g de proteína. La solubilidad de la proteína de soya hidrolizada a pH 3.5 y 4.0 es mucho más baja en comparación a pH 3.0. Esto puede ser debido al acercamiento del pH al punto isoeléctrico de la proteína. Aun así, incluso a los más bajos valores de grado de hidrólisis, la solubilidad de la proteína hidrolizada a pH 3.5 y 4.0 es mejor que la proteína no hidrolizada a los mismos valores de pH.

Estos niveles de solubilidad pueden ser aceptables para la aplicación de la proteína en alimentos con condiciones ácidas. El aumento del GH de la proteína podría aumentar aún más la solubilidad de la proteína. Sin embargo, el aumento del GH puede desarrollar el gusto amargo que no es deseable para ser utilizada en una bebida alta en proteína (de la Barca *et al.*, 2000).

Cuadro 3. Solubilidad (%) de la proteína de soya aislada hidrolizada con alcalasa a diferentes concentraciones de alcalasa a pH 3.0, 3.5 y 4.0. [1]

Solubilidad			
Concentración de alcalasa (AU/g proteína)	pH		
	3.0	3.5	4.0
0.0001	74.42 ± 0.70^{Aa}	20.87 ± 0.48^{CDb}	7.13 ± 0.86^{Dc}
0.001	72.60 ± 1.06^{ABa}	20.03 ± 1.12^{CDb}	7.27 ± 0.47^{CDc}
0.005	72.55 ± 2.05^{ABa}	20.58 ± 0.87^{CDb}	8.11 ± 0.82^{CDc}
0.01	70.68 ± 1.12^{Ba}	21.48 ± 0.41^{Cb}	8.82 ± 1.94^{CDc}
0.05	73.74 ± 0.29^{Aa}	19.78 ± 2.39^{CDb}	9.63 ± 0.27^{Cc}
0.10	73.45 ± 0.61^{Aa}	18.78 ± 1.48^{Db}	12.56 ± 1.30^{Bc}
1.50	74.89 ± 1.09^{Aa}	47.00 ± 3.27^{Bb}	38.54 ± 1.18^{Ac}
2.00	74.48 ± 2.10^{Aa}	51.20 ± 1.43^{Ab}	40.39 ± 2.15^{Ac}
% CV	3.6885		

[1] Los valores con letras mayúsculas diferentes en la misma columna y los valores con minúsculas diferentes en la misma fila son significativamente diferentes entre sí ($P<0.05$).

Propiedad emulsionante. La actividad y la estabilidad emulsionante de la proteína de soya hidrolizada a pH 3.0 y 4.0 con concentraciones de alcalasa de 0.0001, 0.005 y 1.5 AU/ g de proteína fueron evaluadas. Resultados se muestran en los Cuadros 4 y 5. Los valores de EA de la proteína de soya hidrolizada a un pH de 3.0 y 4.0 oscilaron entre 0.49 a 0.63 y 0.19 a 0.24, respectivamente. Mientras que los valores ES a pH 3.0 y 4.0 oscilaron 12.2 – 14.7 y 18.7 – 56.0, respectivamente.

Cuadro 4. Actividad emulsionante (ABS) de proteína de soya aislada hidrolizada con diferentes concentraciones de alcalasa a pH 3.0 y 4.0. [1]

	Actividad Emulsionante			
pH	Concentración de alcalasa (AU/g proteína)			
	0	0.0001	0.005	1.5
3.0	0.63 ± 0.04^{Aa}	0.58 ± 0.03^{Ab}	0.62 ± 0.02^{Aab}	0.49 ± 0.04^{Ac}
4.0	0.24 ± 0.03^{Ba}	0.19 ± 0.03^{Ba}	0.23 ± 0.02^{Ba}	0.22 ± 0.02^{Ba}
% CV	6.8387			

[1] Los valores con letras mayúsculas diferentes en la misma columna y los valores con minúsculas diferentes en la misma fila son significativamente diferentes entre sí ($P<0.05$).

Cuadro 5. Estabilidad emulsionante (min) de proteína de soya aislada hidrolizada con diferentes concentraciones de alcalasa a pH 3.0 y 4.0. [1]

	Estabilidad Emulsionante			
pH	Concentración de alcalasa (AU/g proteína)			
	0	0.0001	0.005	1.5
3.0	13.8 ± 0.3^{Ba}	14.7 ± 0.4^{Ba}	13.1 ± 0.6^{Ba}	12.2 ± 0.4^{Ba}
4.0	25.5 ± 4.3^{Ac}	18.7 ± 0.9^{Ad}	29.2 ± 1.5^{Ab}	56.0 ± 2.8^{Aa}
% CV	8.9909			

[1] Los valores con letras mayúsculas diferentes en la misma columna y los valores con minúsculas diferentes en la misma fila son significativamente diferentes entre sí ($P<0.05$).

Tanto EA y ES tuvieron diferencias significativas cuando la proteína se hidroliza en pH 3.0 a diferentes concentraciones de alcalasa. A este pH, la EA disminuye cuando aumenta excesivamente el GH, especialmente cuando la hidrólisis se produjo a una concentración alta alcalasa (1.5 AU / g de proteína). Se ha demostrado que existe una disminución en la EA cuando se alcanza un elevado GH (Qi *et al.,* 1997). A pH 3.0 también se redujo la ES cuando se utilizó la mayor concentración de alcalasa.

La hidrólisis en porcentajes superiores a 8% puede causar la pérdida de esta propiedad funcional debido a los grupos hidrofóbicos e hidrofílicos en desequilibrio de los hidrolizados de la proteína de soya (Lee, 2011; Tsumura, 2005; Villanueva *et al.,* 1999).

La EA aumentó a medida que el pH de la hidrólisis pasó de 4.0 a 3.0. Este aumento podría ser debido a una mayor solubilidad y GH de la SPA a pH 3.0.

Kim *et al.* (1990) informaron que aumentar el GH, añadiendo más moléculas de péptidos y exponiendo más aminoácidos hidrofóbicos de la proteína, podría mejorar la formación de una emulsión. Un mayor GH también podría disminuir el tamaño molecular de los péptidos de la proteína, causando una mayor adhesión de proteínas a la interfaz aceite-agua (Lam y Nickerson, 2013). Además, las pequeñas moléculas de péptidos producidos por la hidrólisis de la proteína están más propensos a difundirse a una velocidad mayor en la interfaz de aceite formada por la emulsión (McClements, 2012).

Se observó una disminución de la ES de los hidrolizados de proteína a pH 3.0 en comparación con los hidrolizados a pH 4.0. La disminución en ES a pH 3.0 puede ser probablemente debido a su mayor GH (9.2% a una concentración de 1.5 AU/g de proteína, en comparación con 6.2% o menos a menores concentraciones). En general, casi todos los hidrolizados de proteína tienen una menor estabilidad en comparación con la proteína de soya no-hidrolizada. Sin embargo, para los hidrolizados generados a pH 3.0, se observó una ligera disminución de ES cuando se utilizó más alcalasa para hidrolizar la proteína. La disminución puede ser debida a la reducción de la viscosidad de la fase continua y a la formación de una película interfacial cohesiva, como resultado de la formación de péptidos más pequeños por hidrólisis (Qi *et al.*, 1997).

Por el contrario, un aumento en ES de los hidrolizados obtenidos a pH 4.0, fueron obtenidos a medida que se usó mayor concentración de alcalasa. La ES de los hidrolizados obtenidos utilizando una concentración de alcalasa de 1.5 AU/ g de proteína fue de 56.0%, este valor es mucho más alto que la ES de otros hidrolizados con un GH menor al 3.0%. Esta alta ES puede ser debido a su GH limitado (3.0%) pero alta en solubilidad. A mayor solubilidad, más proteína podría ser introducida en la emulsión, lo que conduciría a más proteínas entre las interfaces de agua y aceite (Qi *et al.,* 1997).

El control de la hidrólisis parcial de la proteína es un parámetro crucial para la mejora de la formación de emulsión, así mismo lo es el pH al cuál se hidroliza. Por otro lado, la hidrólisis excesiva podría conducir a propiedades emulsionantes desfavorables de los hidrolizados de proteína generados. Se necesita un buen equilibrio entre el GH, que dicta los tamaños moleculares de los péptidos de la proteína, y la solubilidad para obtener propiedades emulsionantes deseables de la proteína hidrolizada.

Propiedad espumante. El Cuadro 6 muestra la FC de los hidrolizados de proteína de soya utilizando alcalasa a diferentes concentraciones y pH. Las propiedades espumantes de la proteína de soya hidrolizada a pH 3.0 y 4.0 fueron 44.9 a 46.3 y 31.2 a 41.3 ml para FC, respectivamente, y 25.5 a 35.2 y 12.8 a 15.1 para FS, respectivamente. En base a los resultados, no se encontró diferencias significativas en la FC de los hidrolizados, a pH 3.0, con respecto al control. Sin embargo, entre ambos pH, hubo una diferencia significativa en la FC de los hidrolizados cuando se utilizó alcalasa a una concentración de 1.5 AU/ g de proteína. En menores concentraciones de alcalasa (0.0001 y 0.005 AU / g de proteína), no hubo ninguna diferencia significativa de la FC.

Cuadro 6. Capacidad espumante (ml) de proteína de soya aislada hidrolizada con diferentes concentraciones de alcalasa a pH 3.0 y 4.0. [1]

Capacidad Espumante				
pH	Concentración de alcalasa (AU/g proteína)			
	0	0.0001	0.005	1.5
3.0	45.0 ± 3.2^{Aa}	44.9 ± 3.0^{Aa}	44.4 ± 0.7^{Aa}	46.3 ± 3.2^{Aa}
4.0	38.2 ± 7.7^{Bab}	41.3 ± 3.8^{Aa}	40.3 ± 6.1^{Aa}	31.2 ± 2.4^{Bb}
%CV	7.9333			

[1] Los valores con letras mayúsculas diferentes en la misma columna y los valores con minúsculas diferentes en la misma fila son significativamente diferentes entre sí ($P<0.05$).

Por otro lado, para los hidrolizados generados a pH 4.0, se observó una disminución de la FC cuando se aumentó la concentración de alcalasa utilizada, especialmente a la concentración de 1.5 AU/ g de proteína. Esto podría ser debido a un aumento del GH cuando se utiliza más alcalasa para la hidrólisis. Kong *et al.* (2007) y Martínez *et al.* (2011), informaron que un mayor GH puede ser responsable de la disminución en la formación de espuma causando una baja FC.

Valores de FS de hidrolizados obtenidos a pH 3.0 y 4.0 oscilaron entre 25.5 – 35.2 y 12.8 – 15.1, respectivamente (Cuadro 7). Hubo un ligero aumento de la FS de los hidrolizados de pH 3.0 cuando el GH aumenta debido a un incremento de alcalasa utilizada. Controlar el GH limita a un tamaño molecular pequeño de los polipéptidos generados, contribuyendo a la mejora de la FC de los hidrolizados obtenidos en estos pH. Un resultado similar fue observado por Ruiz-Henestrosa *et al.* (2007) cuando determinaron las características de formación de espuma de la β-conglicinina de la soya después de una hidrólisis limitada con alcalasa.

Cuadro 7. Estabilidad espumante (ml) de proteína de soya aislada hidrolizada con diferentes concentraciones de alcalasa a pH 3.0 y 4.0. [1]

Estabilidad Espumante				
pH	Concentración de alcalasa (AU/g proteína)			
	0	0.0001	0.005	1.5
3.0	31.8 ± 4.3^{Aa}	25.5 ± 4.0^{Ab}	32.3 ± 3.0^{Aa}	35.2 ± 3.2^{Aa}
4.0	14.5 ± 0.5^{Ba}	15.1 ± 1.2^{Ba}	14.3 ± 0.7^{Ba}	12.8 ± 0.2^{Ba}
%CV	11.9281			

[1] Los valores con letras mayúsculas diferentes en la misma columna y los valores con minúsculas diferentes en la misma fila son significativamente diferentes entre sí ($P<0.05$).

Por el contrario, de la Barca *et al.,* (2000) informaron que hubo una disminución en la FS cuando el GH aumentó. Este resultado es similar en este estudio, cuando se produjeron los hidrolizados a pH 4.0. Valores de FS de estos hidrolizados producidos a este pH disminuyeron significativamente a medida que el GH aumentó debido al aumento de alcalasa utilizada en la hidrólisis. Esto se puede ver a partir de la FS del hidrolizado obtenido usando alcalasa en una concentración de 1.5 AU / g de proteína. Un mayor GH aumenta el número de cadenas de polipéptidos con pesos moleculares más pequeños. Estos polipéptidos más pequeños no tienen la capacidad de estabilizar las células de las burbujas de gas de la espuma (Kong *et al.,* 2007).

Polipéptidos pequeños desarrollados durante la hidrólisis desestabilizan la espuma formada por la interacción de residuos de los aminoácidos hidrófobos expuestos (Panyam y Kilara, 1997). Aparentemente, los polipéptidos de bajo peso molecular son responsables de un efecto perjudicial en las capas líquidas que separan las burbujas de gas, formadas para atrapar las burbujas de gas durante la formación de la espuma. Las propiedades moleculares de los hidrolizados de proteína juegan un papel crucial para la formación de espuma, similar a las requeridas para la emulsión.

4. CONCLUSIONES

- A medida que el pH aumenta, el grado de hidrólisis y la solubilidad de la proteína de soya aislada y tratada con alcalasa, disminuye.

- A medida que el pH aumenta, hay poca actividad pero alta estabilidad emulsionante de la proteína.

- Se determinó una capacidad espumante similar a pH 3.0 y 4.0, y mayor estabilidad espumante a pH 3.0 que a pH 4.0.

- Mayores concentraciones de alcalasa son necesarias para hidrolizar la proteína de soya a pH cercanos al punto isoeléctrico de la proteína, con el fin de obtener mejor solubilidad.

5. RECOMENDACIONES

- Utilizar una combinación de alcalasa con otras enzimas que sean muy activas a pH bajos para la hidrólisis cercana al punto isoeléctrico de la proteína de soya aislada.

- Aplicar ultrasonido de alta intensidad como un pre-tratamiento a la hidrólisis de la proteína.

6. LITERATURA CITADA

Achouri, A., Zhang, W., y Shiying, X. 1998. Enzymatic hydrolysis of soy protein isolate and effect of succinylation on the functional properties of resulting protein hydrolysates. Food Research International. 31(9): 617 – 623.

Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 27(6): 1256-1262.

Barać, M. B., Stanojević, S. P., Jovanović, S. T. y Pešić, M. B. 2004. Soy protein modification – a review. Acta Periódica Technologica (APTEFF). 35: 3–16.

Barca, A. M. C. de la, Ruiz-Salazar, R. A. y Jara-Marini, M. E. 2000. Enzymatic hydrolysis and synthesis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties. Journal of Food Science. 65(2): 246–253.

Base SAS® 9.3 TS1M2. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Beecher J. W., Drake M. A., Luck P. J., Foegeding E. A. 2008. Factors regulating astringency of whey protein beverages. Journal of Dairy Science. 91(7): 2553–2560.

Benítez, R., Ibarz, A. y Pagan, J. 2008. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 42(2): 227–236.

Bera, M. B. y Mukherjee, R. K. 1989. Solubility, emulsifying and foaming properties of rice bran protein concentrates. Journal of Food Science. 54: 142–145.

Chen, L., Chen, J., Ren, J. y Zhao, M. 2011. Effects of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of soy protein isolates and on the emulsifying properties of hydrolysates. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 59: 2600–2609.

Chen, N., Lin, L., Sun, W. y Zhao, M. 2014. Stable and pH sensitive protein nanogels made by Self-Assembly of heat denatured Soy protein. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 62: 9553–9561.

Chove, B. E., Grandison, A. S. y Lewis, M. J. 2001. Emulsifying properties of soy protein isolate fractions obtained by isoelectric precipitation. Journal of the Science of Food and Agriculture. 81(8): 759–763.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, US). 2015. División Estadística. Cinco mayores productores de Soya (en línea). Consultado 15 Abril 2015. Disponible en http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E

Gao, B. y Zhao, X. 2012. Modification of soybean protein hydrolysates by alcalase-catalyzed plastein reaction and the ACE-inhibitory activity of the modified product in vitro. International Journal of Food Properties. 15: 982–996.

Horax, R., Hettiarachchy, N. S., Chen, P. y Jalaluddin, M. 2004a. Functional properties of protein isolate from cowpea (Vigna unguiculata L. Walp.). Journal of Food Science. 69: 119–121.

Horax, R., Hettiarachchy, N. S., Chen, P. y Jalaluddin, M. 2004b. Preparation and characterization of protein isolate from cowpea (Vigna unguiculata L. Walp.). Journal of Food Science. 69: 114–118.

Jung, S., Murphy, P. A. y Johnson, L. A. 2005. Physicochemical and functional properties of soy protein substrates modified by low levels of protease hydrolysis. Journal of Food Science. 70: 180–187.

Jung, S., Roussel-Philippe, C., Briggs, J. L., Murphy, P. A. y Johnson, L. A. 2004. Limited hydrolysis of soy proteins with endo- and exoproteases. Journal of the American Oil Chemists´ Society. 81(10): 953–960.

Kato, A., Takahashi, A., Matsudomi, N. y Kobayashi, K. 1983. Determination of foaming properties of proteins by conductivity measurement. Journal of Food Science. 48: 62–65.

Kim, S. Y., Park, P. S., y Rhee, K. C. 1990. Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 38(3): 651–656.

Kong, X., Zhou, H., y Qian, H. 2007. Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. Food Chemistry. 101: 615–620

Lam, R. S. H. y Nickerson, M. T. 2013. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach. Food Chemistry. 141:975–984.

Lee, Jookyeong. 2011. Soy Protein Hydrolysate; solubility, thermal stability, bioactivity, and sensory acceptability in a tea beverage. Tesis M.Sc., Vickers, Universidad de Minnesota, Estados Unidos. 131 p.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 265–275.

Martínez, K. D., Farías, M. E. y Pilosof, A. M. R. 2011. Effects of soy protein hydrolysis and polysaccharides addition on foaming properties studied by cluster analysis. Food Hydrocolloids. 25: 1667-1676.

McClements, D. J. 2012. Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 17: 235–245.

Nielsen, P. M., Petersen, D. y Dambmann, C. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. Journal of Food Science. 66: 642–646.

Nishinari, K., Fanga, Y., Guo S. y Phillips, G. O. 2014. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. Food Hydrocolloids. 39:301–318.

Ortiz, S. E. M. y Wagner, J. R. 2002. Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. Food Research International. 35(6): 511–518.

Panyam, D. y Kilara, A. 1996. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. Trends in Food Science and Technology. 7: 120–125.

Pearce, K. N. y Kinsella, J. E. 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of turbidimetric technique. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 26: 716–723.

Qi, M., Hettiarachchy, N. S. y Kalapathy, U. 1997. Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. Journal of Food Science. 62: 1110–1115.

Radha, C. y Prakash, V. 2009. Structural and functional properties of heat-processed soybean flour: Effect of proteolytic modification. Food Science and Technology International. 15: 453–463.

Rubio, F. C., Tello, P. G., Dueñas, M. P., Moreno, M. C. M. y Cuadrado V. F. 1993. Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 33(1): 59–70.

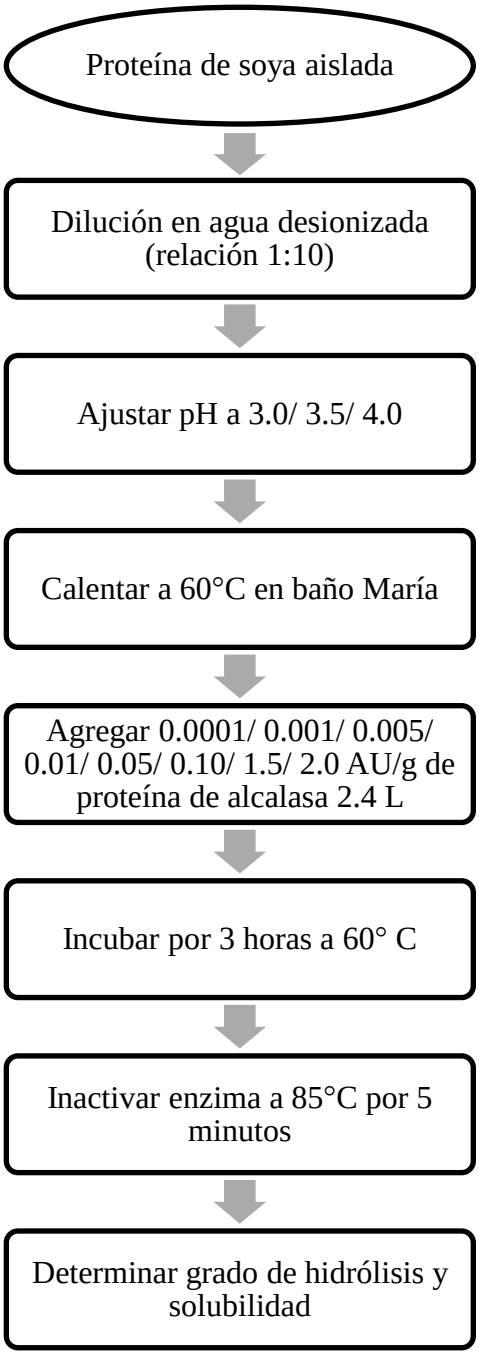
Ruíz-Henestrosa, V. P., Sánchez, C. C., del Mar Yust, M., Pedroche, J., Millán, F. y Patino, J. M. R. 2007. Limited enzymatic hydrolysis can improve the interfacial and foaming characteristics of β-conglycinin. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55: 1536–1545

Söderberg, J. 2013. Functional properties of legume proteins compared to egg proteins and their potential as egg replacers in vegan food. Food Research International. 37: 222–236.

Tsumura, K.. 2009. Improvement of the physicochemical properties of soybean proteins by enzymatic hydrolysis. Food Science and Technology Research. 15:381–388.

Villanueva, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J. y Millán, F. 1999. Peptide characteristics of sunflower protein hydrolysates. Journal of the American Oil Chemists' Society. 76(12): 1455–1460

Wang, W. y de Mejía, E. G. 2005. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 4: 63–78.

7. ANEXOS

Anexo 1. Diagrama de flujo para la preparación de proteína de soya hidrolizada.