



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas-Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

Modificaciones estructurales de las proteínas del lactosuero y su influencia sobre las propiedades funcionales superficiales: emulsificación y espumado.

Presentada por Lic. Germán David Báez

Rosario, Argentina

2012

Modificaciones estructurales de las proteínas del lactosuero y su influencia sobre las propiedades funcionales superficiales: emulsificación y espumado.

Lic. Germán David Báez

Licenciado en Química, Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Área Físicoquímica, Departamento de Química-Física, y el Instituto de Química Rosario (IQUIR), dependientes de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 11/12/2008 y el 14/12/2012 bajo la dirección del Dr. Pablo Andrés Busti.

Nombres y firmas del Director y de los integrantes del Jurado de Tesis:

NOM. Director.....

NOM.....

NOM.....

NOM.....

Defendida:

Dedicada a lore

Índice de contenidos

Agradecimientos.....	ix
Índice.....	v
Índice de figuras.....	x
Índice de tablas.....	xvi
Abreviaturas y símbolos.....	xvii
Publicaciones.....	xx

Agradecimientos

Primero quiero agradecer al director de esta Tesis el Dr. Pablo Busti por otorgarme una oportunidad nunca imaginada y por salvar todo inconveniente que me brindaba la "mesada", mi casa o la vida misma.

Agradecer al Dr. Néstor Delorenzi por la beca para poder iniciar el doctorado y guiarme a través de estos años. También agradecerle tantos consejos y charlas sobre cocina y, principalmente, automovilismo.

A la Dra. Roxana Verdini por su interés en ser directora de la beca tipo II y su predisposición a ayudarme para continuar el camino iniciado años atrás.

A mi compañera de "mesada", cursos, congresos y toda actividad académica imaginable la Dra. Griselda Bellerini por su ingenio para hacer llevable las interminables horas de incubación y medición.

A la Dra. Andrea Moro por su infaltable "germancito cualquier duda preguntame!".

A todos los compañeros que han pasado por el grupo de investigación: evi, Alexis, Julia, el presidente, pol y Felipe.

A todos los compañeros de Fisicoquímica, especialmente con quienes compartí preparación de laboratorios por soportar mi enojo cuando algo no salía. A mauri por las medialunas, geor por sus historias, Alexis por ser parte de esas historias, ale por HSE, tomi por nada, maru por sus clases (llena de chicos), nati por ana chamot, seba por bolivariano y romi por antibolivariana. A Julieta, Manuel y Cecilia. A la mamá de tomi y a sole por tantísimos mates. A mili, ani, Ana y muchos otros que seguro no estoy recordando.

A los "jefes" de Fisicoquímica por alentarme en la docencia y por la excelente predisposición para ayudarme en todo momento.

Al IQUIR y a la división Analítica por abrirme tan amablemente las puertas.

A los "analíticos" por las peñas.

A los "químicos" por el fútbol y la cerveza. O cerveza y fútbol dependiendo la época.

A mis amigos de siempre: Albarracín, Abel, javi, buba, Pablo, gec, Marcelo y los Carlos. A huguito siempre presente.

A mi cuñada y esos dos terribles zapatudos.

A mis padres y hermanos, pilares de mi vida.

A lore, mi familia, por aguantarme en la tesina y la tesis.

Índice

1.	Introducción.....	1
1.1.	Ciencia e industria de los alimentos y sociedad	1
1.2.	Proteínas y propiedades funcionales	1
1.3.	Proteínas lácteas	2
1.3.1.	Beta-lactoglobulina y proteínas del suero lácteo.....	2
1.4.	Propiedades funcionales superficiales de las proteínas.....	4
1.4.1.	Migración y adsorción de las proteínas en las interfases.....	4
1.4.2.	Formación de la capa interfacial.....	4
1.5.	Emulsiones	5
1.5.1.	Emulsificación y estabilidad.....	5
1.5.2.	Mecanismos de desestabilización de las emulsiones.....	7
1.6.	Espumas.....	10
1.6.1.	Formación de espumas	12
1.6.2.	Estabilización de espumas	12
1.7.	Modificaciones proteicas y cambios en las propiedades funcionales superficiales	14
1.7.1.	Tratamiento térmico	14
1.7.2.	Hidrólisis enzimática	15
1.7.3.	Polimerización enzimática.....	15
1.7.4.	Reacción de Maillard.....	16
1.8.	Caracterización estructural de la β -LG.....	17
1.8.1.	Modelos de desnaturalización proteico	17
1.8.3.	Determinación de la hidrofobicidad superficial por medidas de fluorescencia.....	18
1.8.3.1.	Efecto de la desnaturalización proteica sobre la hidrofobicidad superficial.....	19
1.8.3.2.	Estudio de la desnaturalización por extinción de la fluorescencia intrínseca de la β -LG con acrilamida.....	19
1.8.4.	Dicroísmo circular	20
1.8.5.	Viscosidad intrínseca.....	20
1.8.6.	Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	20
1.9.	Caracterización de las propiedades funcionales de la β -LG.....	21

1.9.1.	Estudio de las emulsiones.....	21
1.9.1.1.	Estudio de las emulsiones por turbidimetría.....	21
1.9.1.2.	Estudio de las emulsiones por análisis de tamaño de gota	21
1.9.2.	Estudio de las espumas	23
1.10.	Objetivos.....	24
2.	Materiales y Métodos	25
2.1.	Reactivos químicos.....	25
2.2.	Soluciones de uso general	25
2.2.1.	Solución reguladora fosfato 20 mM pH 6,8	25
2.2.2.	Solución reguladora fosfato 50 mM pH 7,0 y pH 6,8	25
2.2.3.	Solución reguladora Tris-HCl 50 mM pH 7,0 y pH 8,0	25
2.2.4.	Solución de β -LG	25
2.2.5.	Solución de Tripsina.....	26
2.2.6.	Solución de SDS estabilizante de emulsiones	26
2.2.7.	Solución de acrilamida	26
2.2.8.	Solución de urea	26
2.2.9.	Solución de cisteína	26
2.3.	Equipos utilizados	26
2.3.1.	Medidas espectroscópicas.....	26
2.3.2.	Medidas espectrofluorométricas.....	27
2.3.3.	Homogenizador	27
2.3.4.	Liofilizador	27
2.3.5.	Conductímetro	27
2.3.6.	Peachímetro	27
2.3.7.	Equipos varios	27
2.3.8.	Programas de computación.....	27
2.4.	Tratamientos realizados a la β -LG	28
2.4.1.	Tratamiento térmico	28
2.4.2.	Tratamiento transglutaminasa en presencia de cisteína.....	28
2.4.3.	Tratamiento transglutaminasa en presencia de cisteína y posterior hidrólisis con tripsina a pH 8,0.....	28
2.4.4.	Glicosilación y tratamiento térmico	28
2.5.	Métodos	29

2.5.1.	Determinación del grado de hidrólisis.....	29
2.5.2.	Electroforesis.....	30
2.5.2.1.	Análisis de geles:.....	31
2.5.3.	Determinación de la hidrofobicidad superficial por medidas de fluorescencia.....	32
2.5.4.	Estudio de la desnaturalización de la β -LG. Modelos de desnaturalización.....	32
2.5.5.	Desnaturalización química de la β -LG seguida por medidas de fluorescencia. Determinación del λ_{max} de emisión y extinción de la fluorescencia intrínseca con acrilamida.....	33
2.5.6.	Desnaturalización térmica de la β -LG seguida por medidas de absorbancia en el UV.....	35
2.5.7.	Análisis estructural por medidas de viscosidad intrínseca.....	35
2.5.8.	Dicroísmo circular (DC).....	37
2.5.9.	Determinación de grupos amino disponibles.....	37
2.5.10.	Ultrafiltración.....	38
2.5.11.	Determinación de las propiedades emulsionantes.....	39
2.5.11.1.	Preparación de las emulsiones.....	39
2.5.11.2.	Estudio de las emulsiones por turbidimetría.....	39
2.5.11.3.	Estudio de las emulsiones por análisis de tamaño de gota.....	41
2.5.11.4.	Separación de fases de las emulsiones.....	42
2.5.12.	Evaluación de las propiedades espumantes.....	42
2.5.13.	Diseño de experimentos.....	48
2.5.14.	Análisis estadístico.....	48
3.	Resultados y discusión.....	49
3.1.	Tratamiento térmico.....	49
3.1.1.	Conocimientos previos.....	49
3.1.2.	Electroforesis.....	50
3.1.3.	Dicroísmo circular.....	51
3.1.4.	Extinción de la fluorescencia.....	53
3.1.5.	Desnaturalización química por medidas de fluorescencia.....	55
3.1.6.	Desnaturalización térmica por diferencia de absorbancia a 293 nm.....	57
3.1.7.	Cambios conformacionales.....	58

3.1.8.	Espumas.....	58
3.1.9.	Emulsiones	61
3.1.10.	Comparación entre las propiedades espumantes y emulsionantes de la β -LG tratada térmicamente	64
3.2.	Polimerización enzimática con transglutaminasa. Comparación con el tratamiento térmico.....	66
3.2.1.	Conocimientos previos	66
3.2.2.	Electroforesis	67
3.2.3.	Extinción de la fluorescencia.....	68
3.2.4.	Desnaturalización química por medidas de fluorescencia.....	69
3.2.5.	Dicroísmo circular	70
3.2.6.	Viscosidad intrínseca.....	73
3.2.7.	Comparación entre el calentamiento y el tratamiento enzimático.....	74
3.2.8.	Espumas.....	75
3.2.9.	Comparación entre tratamiento térmico y enzimático con TG.....	78
3.3.	Polimerización de la β -LG con transglutaminasa y posterior hidrólisis con tripsina.....	81
3.3.1.	Conocimientos previos	81
3.3.2.	Determinación del grado de hidrólisis.....	81
3.3.3.	Dicroísmo circular	83
3.3.4.	Electroforesis	86
3.3.5.	Propiedades espumantes	86
3.4.	Glicosilación y tratamiento térmico. Efecto en las propiedades espumantes. 90	
3.4.1.	Conocimientos previos	90
3.4.2.	Electroforesis	90
3.4.3.	Extensión de la glicosilación	92
3.4.4.	Dicroísmo circular	93
3.4.5.	Desnaturalización por extinción de la fluorescencia	95
3.4.6.	Desnaturalización por espectroscopia UV.....	97
3.4.7.	Energía libre para el proceso de desnaturalización en dos estados	99
3.4.8.	Espumas.....	99
4.	Conclusiones.....	104

4.1.	Tratamiento térmico de la β -LG. Cambios estructurales y propiedades espumantes.....	104
4.2.	Tratamiento térmico de la β -LG y sus propiedades emulsionantes. Comparación entre las propiedades espumantes y emulsionantes	105
4.3.	Polimerización enzimática con transglutaminasa de la β -LG. Cambios estructurales y comparación con la polimerización térmica.....	106
4.4.	Polimerización con transglutaminasa y posterior hidrólisis con tripsina de la β -LG. Cambios estructurales y propiedades espumantes	106
4.5.	Glicosilación de la β -LG con glucosa y combinación con tratamiento térmico. Modificaciones estructurales y propiedades espumantes	107
5.	Resumen	108
6.	Bibliografía.....	110

Índice de figuras

Figura 1.1: Estructura de la β -LG. (Tomado de “Desarrollo de un biorreactor con proteasas inmovilizadas para la hidrólisis limitada de proteínas del lactosuero y posterior análisis de las propiedades funcionales superficiales de los hidrolizados obtenidos” [11]).	3
Figura 1.2: Homogeneizador de alta velocidad empleado para preparar emulsiones. (Tomado de “Propiedades fisicoquímicas y estructurales de estados no nativos de k-caseína bovina y su relación con propiedades de estabilización de emulsiones” [19]).	6
Figura 1.3: Sistema termodinámico de una emulsión. (Tomado de “ <i>Food Emulsions</i> ” [18]).	7
Figura 1.4: Variación de las energías potenciales en función de la distancia entre gotas. (Tomado de “Ciencia de los alimentos” [2]).	8
Figura 1.5: Diagrama esquemático de la estabilización electrostática (Tomado de “ <i>Methods of testing proteins functionality</i> ” [1]).	9
Figura 1.6: Representación esquemática de una proteína en la interfase (Tomado de “ <i>Methods of testing proteins functionality</i> ” [1]).	9
Figura 1.7: Efecto estérico debido a la adsorción proteica (Tomado de “ <i>Methods of testing proteins functionality</i> ” [1]).	10
Figura 1.8: Estructura de una espuma (Tomado de “Ciencia de los alimentos” [2]).	11
Figura 1.9: Representación esquemática de los procesos de desestabilización de una espuma y vista ampliada de la película inter-burbuja (Tomado de “Caracterización funcional y estructural de proteínas” [12]).	13
Figura 1.10: Estructura primaria de la β -LG. En rojo se indican la uniones entre aminoácidos capaces de ser atacados por la tripsina (Tomado de “Desarrollo de un biorreactor con proteasas inmovilizadas para la hidrólisis limitada de proteínas del lactosuero y posterior análisis de las propiedades funcionales superficiales de los hidrolizados obtenidos” [11]).	15
Figura 1.11: Esquema de reacción de transglutaminación. La transglutaminasa cataliza la transferencia acílica entre el grupo γ -carboxiamida de glutamina (donador de acilo) y distintos aceptores de acilos: aminos primarios (I), por ejemplo la ϵ -amina de la lisina	

(II) y sin aminos puede catalizar la desaminación de glutamina con H ₂ O como el aceptor de acilo (III) (Tomado de “ <i>Food Chemistry</i> ” [13]).	16
Figura 1.12: Esquema de la reacción de Maillard entre una molécula de lisina y una de glucosa. Primero se forma la imina (base de Schiff) y luego se realiza el llamado reordenamiento de Amadori (Tomado de “ <i>Food Chemistry</i> ” [13]).	17
Figura 1.13: Molécula de acrilamida utilizada como extintor de la fluorescencia intrínseca en la determinación de la extensión de la desnaturalización de la β-LG.	19
Figura 1.14: Distribución de tamaño de gotas en volumen, superficie, longitud y número.	22
Figura 2.1: Reacción del TNBS con grupos aminos. (Tomado de “Desarrollo de un biorreactor con proteasas inmovilizadas para la hidrólisis limitada de proteínas del lactosuero y posterior análisis de las propiedades funcionales superficiales de los hidrolizados obtenidos” [11]).	30
Figura 2.2: Espectros de emisión de fluorescencia de β-LG nativa (—) y β-LG desnaturalizada (·····) a una longitud de onda de excitación de 295 nm. Se observa un corrimiento del λ _{max} de emisión hacia mayores longitudes de onda (corrimiento al rojo).	34
Figura 2.3: Reacciones del método de glicemia enzimática.	38
Figura 2.4: Equipo para la preparación de las emulsiones. Las mismas se realizaron por homogenización mecánica de la mezcla aceite/solución proteica en tubos Falcon.	39
Figura 2.5: Tubo Falcon adaptado para la extracción de alícuotas de las emulsiones obtenidas.	41
Figura 2.6: Analizador de tamaño de partícula de la Universidad Nacional de Quilmes.	41
Figura 2.7: Separación de fases u <i>oiling off</i> . En la parte inferior se encuentra la “fase acuosa”, la cual es una emulsión con menor proporción de gotas de aceite. En la mitad se encuentra la “fase crema” de abundante gotas de aceite. Sobre esta última se halla la fase aceite separada de la emulsión.	42
Figura 2.8: “Espumómetro”. La manguera celeste proviene del dispositivo esquematizado en la Figura 2.9.	43

Figura 2.9. Los elementos constitutivos de este equipo son: 1. llave de paso del tanque de gas nitrógeno; 2. manómetro de presión del tanque; 3. manómetro de presión de salida; 4. llave reguladora de la presión de 3; 5. válvula de seguridad; 6. llave exclusiva; 7. regulador del manómetro de presión de trabajo; 8. manómetro de presión de trabajo; 9. micro válvula.	44
Figura 2.10: Forma típica de las curvas de conductividad de la solución espumada en el tiempo. Las unidades de conductividad y tiempo son arbitrarias. La conductividad inicial está dada por el volumen de solución inicial. Al comenzar el espumado la conductividad disminuye en forma lineal hasta un mínimo en cuyo tiempo se detiene el espumado y luego del cual la conductividad aumenta debido al drenado de líquido desde la espuma hacia la solución	45
Figura 2.11: Forma típica de las curvas de volumen de líquido en la espuma (V_{LE}), calculada con la ecuación 2.8, en el tiempo. Las unidades de volumen y tiempo son arbitrarias. V_{LE} antes de iniciarse el espumado tiene un valor igual a cero. Al comenzar el espumado V_{LE} aumenta en forma lineal hasta un máximo en cuyo tiempo se detiene el espumado y luego del cual V_{LE} disminuye debido al drenado de líquido desde la espuma hacia la solución	46
Figura 2.12: Forma típica de las curvas de conductividad de la espuma en el tiempo. Las unidades de conductividad y tiempo son arbitrarias. La conductividad de la espuma antes de iniciarse el espumado tiene un valor igual a cero. Al comenzar el espumado la conductividad de la espuma aumenta en forma lineal hasta un máximo en cuyo tiempo se detiene el espumado y luego del cual disminuye debido al drenado de líquido desde la espuma hacia la solución	47
Figura 3.1: Análisis de imagen generado por software para β -LG tratada térmicamente. Proporción de especies en porcentaje: (●) monómero, (○) dímero, (▼) trímero y (Δ) oligómero versus tiempo de calentamiento de 0 a 15 min.	50
Figura 3.2: Espectros de DC en el UV cercano de la β -LG 25 mg mL ⁻¹ , pH 6,8, calentada a 85 °C desde 0 a 15 min.	51
Figura 3.3: Espectros de DC en el UV lejano de la β -LG 25 mg mL ⁻¹ , pH 6,8, calentada a 85 °C desde 1 a 15 min	52
Figura 3.4: Gráficos de Stern-Volmer correspondientes a la extinción de la fluorescencia intrínseca de la β -LG por adición de acrilamida. β -LG sometida a calentamiento a 85 °C	

durante distintos tiempos: 0 minutos (●), 3 minutos (○), 15 minutos (▼).β-LG en urea 8 M (Δ).	54
Figura 3.5: Valores de K_{SV} obtenidos a partir de las pendientes de los gráficos de Stern-Volmer para β-LG sometida a calentamiento previo a 85 °C durante distintos tiempos.55	
Figura 3.6: Perfiles de desnaturalización de β-LG por acción de urea obtenidos por medidas de λ_{max} . β-LG sometida a calentamiento previo a 85 °C durante distintos tiempos: 0 minutos (●), 1 minutos (○), 3 minutos (▼) y 15 minutos (Δ). $F_{des} = 0,5$ (-----).	56
Figura 3.7: Gráficos de desnaturalización térmica de la β-LG seguida por diferencia de absorbancia a 293 nm. β-LG sometida a calentamiento a 85 °C durante: 0 min (▼), 1 min (●) y 3 min (■).	58
Figura 3.8: Propiedades espumantes de β-LG tratada térmicamente. Los parámetros son informados como proporciones relativas a los de β-LG nativa.	60
Figura 3.9: $D[4,3]/D[4,3]^{\circ}$ en volumen e IAE/IAE° versus tiempo de calentamiento de β-LG 0, 3, 7 y 15 min . Los parámetros son informados como proporciones relativas a los de β-LG nativa. $D[4,3]^{\circ}$ β-LG nativa: 19 ± 1 nm. IAE° β-LG nativa: $12,7 \pm 0,3$ m ² g ⁻¹	62
Figura 3.10: Fotografía de 15 días de estacionamiento de las emulsiones formadas con β-LG tratada térmicamente durante diferentes tiempos. De izquierda a derecha: 0, 1, 3, 5, 7, 10 y 15 min.	63
Figure 3.11: Concentración de proteína (%) de las diferentes especies formadas por incubación de soluciones de β-LG (25 mg mL ⁻¹) con TG en presencia de Cys 0,07 M, a 40 °C, y por diferentes periodos de tiempo: monómeros (●), dímeros (■), trímeros (▲) y agregados que no entraron al gel de corrida (oligómeros y polímeros) (◆). (○) K_{SV} (M ⁻¹) obtenida del gráfico de Stern-Volmer a diferentes tiempos de incubación con TG.....	67
Figura 3.12: Perfil de desnaturalización proteica de diferentes muestras de β-LG, determinados a través de valores de λ_{max} . (●) β-LG nativa, (■) β-LG-Cys, (○) HT-β-LG y (□) TG-β-LG. $F_{des} = 0,5$ (-).....	70
Figura 3.13: Espectros de DC en el UV cercano de la β-LG 25 mg mL ⁻¹ , pH 6,8, tratada con calor o transglutaminasa. La línea vertical marca la elipticidad molar a una longitud de onda de 292 nm.	71

Figura 3.14: Espectros de DC en el UV lejano de la β -LG 25 mg mL ⁻¹ , pH 6,8, tratada con calor o transglutaminasa.	72
Figura 3.15: Posibles estructuras de diferentes especies de β -LG producidas por calentamiento y tratamiento con TG.	75
Figura 3.16: Variación relativa a la proteína sin tratar de la densidad de la espuma (DE/DE°), tiempo medio de drenaje ($T_{1/2}/T_{1/2}^{\circ}$) y tiempo cuarto de colapso ($T_{1/4}/T_{1/4}^{\circ}$) para HT- β -LG (1) y TG- β -LG (2).	76
Figura 3.17: Variación de la densidad de espuma (DE/DE°) (▲), tiempo de vida media de drenaje ($T_{1/2}/T_{1/2}^{\circ}$) (■) y tiempo cuarto de colapso ($T_{1/4}/T_{1/4}^{\circ}$) (●) para TG- β -LG. .	78
Figura 3.18: Curva estándar de L-Leu utilizada para la determinación del grado de hidrólisis	82
Figura 3.19: Espectros de DC en el UV cercano de la β -LG 25 mg mL ⁻¹ , pH 6,8, tratada enzimáticamente con transglutaminasa y tripsina.	83
Figura 3.20: Espectros de DC en el UV lejano de la β -LG 25 mg mL ⁻¹ , pH 6,8, tratada enzimáticamente con transglutaminasa y tripsina.	85
Figura 3.21. Electroforesis de polimerización con transglutaminasa y posterior hidrólisis de la β -LG. Las calles 1, 2 y 3 corresponden a β -LG nativa, TG- β -LG y TG-H- β -LG respectivamente	86
Figura 3.22: Diagrama de Pareto para $T_{1/4}$ para las espumas de β -LG tratada enzimáticamente con transglutaminasa y tripsina.	88
Figura 3.23: Superficie de respuesta para $T_{1/4}$ para las espumas de β -LG tratada enzimáticamente con transglutaminasa y tripsina. $T_{1/4}$ es informado como proporción relativa a la β -LG nativa ($T_{1/4}^{\circ}$).	88
Figura 3.24: Diagrama de Pareto para T_{C10} para las espumas de β -LG tratada enzimáticamente con transglutaminasa y tripsina.	89
Figura 3.25: Superficie de respuesta para T_{C10} para las espumas de β -LG tratada enzimáticamente con transglutaminasa y tripsina. T_{C10} es informado como proporción relativa a la β -LG nativa (T_{C10}°).	89
Figura 3.26: Gel electroforético de β -LG glicosilada. 1: β -LG. 2: GLI- β -LG.	92

Figura 3.27: Señal de DC a 205 nm de diferentes muestras proteicas. Las barras de error fueron calculadas por la desviación estándar de tres replicados. 1 β -LG, 2 β -LG _{control} , 3 GLI- β -LG, 4 HT- β -LG, 5 HT- β -LG _{control} , 6 HT-GLI- β -LG.....	94
Figura 3.28: Señal de CD a 292 nm de diferentes muestras proteicas. Las barras de error fueron calculadas por la desviación estándar de tres replicados. 1 β -LG, 2 β -LG _{control} , 3 GLI- β -LG, 4 HT- β -LG, 5 HT- β -LG _{control} , 6 HT-GLI- β -LG.....	95
Figura 3.29: Constante de Stern-Volmer (K_{SV}) de β -LG glicosiladas y tratadas térmicamente. 1 β -LG, 2 β -LG _{control} , 3 GLI- β -LG, 4 HT- β -LG, 5 HT- β -LG _{control} , 6 HT-GLI- β -LG. Las barras de error se calcularon a partir de la desviación estándar de tres repeticiones.....	96
Figura 3.30: Gráficos de desnaturalización térmica seguida por diferencia de absorbancia a 293 nm de β -LG glicosilada y/o tratada térmicamente. β -LG (●), GLI- β -LG (■), HT-GLI- β -LG (○) y HT- β -LG (□).....	98
Figura 3.31: Parámetros de actividad y estabilidad espumante de la β -LG glicosilada y calentada. 1 β -LG _{control} , 2 GLI- β -LG, 3 HT- β -LG, 4 HT- β -LG _{control} , 5 HT-GLI- β -LG. DE° , $T_{1/2}^\circ$ y $T_{1/4}^\circ$ son los parámetros correspondientes a la β -LG nativa. La barra de error fue calculada de la desviación estándar de tres replicados.	100

Índice de tablas

Tabla 3.1: Desplazamiento del pico de la región de los 210-220 nm hacia la de 200-210 nm de la β -LG 25 mg mL ⁻¹ , pH 6,8, calentada a 85 °C desde 1 a 15 min.....	52
Tabla 3.2: Estudios de fluorescencia de β -LG tratada en presencia de urea. [urea] _{1/2} está determinado por el perfil de desnaturalización química de especies de β -LG en presencia de urea (0-8 M), suponiendo un modelo de dos estados.	57
Tabla 3.3. Estudios de fluorescencia de β -LG tratada en presencia de urea	69
Tabla 3.4: Desplazamiento del pico de la región de los 210-220 nm hacia la de 200-210 nm de la β -LG 25 mg mL ⁻¹ , pH 6,8, tratada con calor o transglutaminasa.	73
Tabla 3.5: Viscosidad intrínseca de diferentes muestras de β -LG tratada con calor o transglutaminasa	73
Tabla 3.6: Porcentaje de grado de hidrólisis de β -LG 25 mg mL ⁻¹ , pH 6,8, para β -LG tratada enzimáticamente con transglutaminasa y tripsina. GH es independiente del tiempo de transglutaminación.....	82
Tabla 3.7: Desplazamiento del pico de la región de los 210-220 nm hacia la de 200-210 nm de la β -LG 25 mg mL ⁻¹ , pH 6,8, para β -LG tratada enzimáticamente con transglutaminasa y tripsina.	85
Tabla 3.8: Significancia estadística (valor p) correspondiente a cada término del modelo ajustado para las espumas de β -LG tratada enzimáticamente con transglutaminasa y tripsina.	87
Tabla 3.9. Contenido de monómeros, dímeros, trímeros y oligómeros de las diferentes muestras de β -LG, determinada por electroforesis SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras.....	91
Tabla 3.10: Grupos aminos disponibles de β -LG glicosilada y/o tratada térmicamente.	93
Tabla 3.11: Valor de energía libre para el proceso de desnaturalización en dos estados en ausencia de urea. ΔG°_D tiene unidades de kJ mol ⁻¹	99

Abreviaturas y símbolos

β -LG	β -lactoglobulina
α -LA	α -lactoalbúmina
Ig	Inmunoglobulina
ASB	Albúmina sérica bovina
WPC	Del inglés: <i>Whey Proteins Concentrate</i>
WPI	Del inglés: <i>Whey Proteins Isolate</i>
γ	Tensión superficial
γ_i	Tensión interfacial
ΔG	Energía libre de Gibbs
ΔG_D	Energía libre de Gibbs para la reacción de desnaturalización
ΔA	Variación del área superficial o interfacial
W/O	Del inglés: <i>Water/oil</i>
O/W	Del inglés: <i>Oil/water</i>
G_T	Energía libre de interacción
G_W	Energía libre de van der Waals
G_E	Repulsión electrostática
Cys	Cisteína
Arg	Arginina
Lys	Lisina
Pro	Prolina
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
Phe	Fenilalanina
Leu	Leucina
HS	Hidrofobicidad superficial
DC	Dicroísmo Circular
η_r	Viscosidad relativa
$[\eta]$	Viscosidad intrínseca
v_2	Volumen específico
v	Factor simha o forma
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en medio desnaturalizante

τ	Turbidez
K	Coefficiente de difusión de la luz
N	Número de partículas
a	Radio medio de la partícula
ϕ	Fracción de aceite
IAE	Índice de actividad emulsionante
V_{FL}	Volumen fase lipídica
V_{TE}	Volumen total de la emulsión
A	Absorbancia
l	Camino óptico
IEE	Índice de estabilidad emulsionante
R	Radio
D	Diámetro
λ	Longitud de onda
GH	Porcentaje de grado de hidrólisis
TEMED	Tetrametiletiléndiamina
TNBS	Trinitrobencenosulfónico
DTT	Ditiotreitol
OPA	O-ftaldialdehído
ANS	ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico
F°	Fluorescencia inicial
K_{SV}	Constante de Stern-Volmer
Q	Concentración del agente extintor
F_N	Fracción del total de proteína en estado nativo
F_{des}	Fracción del total de proteína en estado desnaturalizado
K_D	Constante de equilibrio
DC	Técnica de dicroísmo circular
$[\theta]_{MRW}$	Elipticidad molar media por residuo
n	Número de aminoácidos
C	Concentración
C_t	Conductividad de la solución a espumar en el tiempo
C_{ini}	Conductividad inicial de la solución a espumar
C_{Et}	Conductividad de la espuma en el tiempo
V_{LE}	Volumen de líquido en la espuma

V_{LEmax}	Volumen de líquido máximo incorporado en la espuma
V_{Emax}	volumen de espuma llegado al final del período de burbujeo
DE	Densidad de la espuma
$T_{1/2}$	Tiempo de vida media de drenaje
$T_{1/4}$	Tiempo cuarto de volumen de espuma
T_{C10}	Tiempo en que $C_{Et} < 10 \text{ mS m}^{-1}$
R^2	Coefficiente de regresión

Publicaciones

Los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Tesis fueron publicados en los siguientes artículos científicos:

Báez, G.D., A. Moro, G.A. Ballerini, P.A. Busti, y N.J. Delorenzi, Comparison between structural changes of heat-treated and transglutaminase cross-linked beta-lactoglobulin and their effects on foaming properties. *Food Hydrocolloids*, (2011). **25**(7): p. 1758-1765.

Moro, A., G.D. Báez, P.A. Busti, G.A. Ballerini, y N.J. Delorenzi, Effects of heat-treated [beta]-lactoglobulin and its aggregates on foaming properties. *Food Hydrocolloids*, (2011). **25**(5): p. 1009-1015.

Delorenzi, N.J., A. Moro, P.A. Busti, G.D. Báez, y G.A. Ballerini, Effects of Structural Changes in β -Lactoglobulin on its Allergenicity, en *Whey: Types, Composition and Health Implications*, R.M. Benitez y G.M. Ortero, Editores. (2012), Nova Publishers. p. 169-182.

Moro, A., G.D. Báez, G.A. Ballerini, P.A. Busti, y N.J. Delorenzi, Emulsifying and foaming properties of β -lactoglobulin modified by heat treatment. *Food Research International*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.011>.

1. Introducción:

1.1. Ciencia e industria de los alimentos y sociedad

Desde los trabajos de Gay-Lussac y Thenard para determinar los porcentajes de carbono, hidrógeno y nitrógeno en sustancias vegetales hasta las modernas técnicas de análisis físicoquímicos la ciencia de los alimentos ha sido una de las herramientas utilizadas para modificar las prácticas culturales y alimenticias.

En la actualidad existe un creciente interés en reemplazar ingredientes artificiales por otros de origen natural. Socialmente se debe al deseo de retomar prácticas alimenticias modificadas en el transcurso del siglo XX consideradas menos saludable y en este sentido la ciencia y la industria tienen la necesidad de responder a esta demanda social.

1.2. Proteínas y propiedades funcionales

Las macromoléculas son componentes fundamentales de los alimentos. Las proteínas, como grupo de macromoléculas, son ampliamente utilizadas como aditivos alimenticios debido a sus propiedades nutritivas y funcionales. Las características sensoriales de los alimentos muchas veces están determinadas por las propiedades funcionales de las proteínas.

Una proteína puede tener gran capacidad nutritiva y no poseer propiedades funcionales adecuadas para su incorporación en los alimentos. Las propiedades funcionales se pueden definir como toda propiedad no nutricional que influye en el comportamiento de los alimentos [1]. Las proteínas pueden mejorar ciertas propiedades funcionales y en tal sentido son utilizadas como espesantes, gelificantes, espumantes, emulsionantes, etc. [2]. A pesar de esto se debe tener en cuenta que la adición de proteínas puede ser beneficioso, por suministrar aminoácidos para la síntesis de proteínas o péptidos bioactivos, o perjudicial, por causar una respuesta alérgica [3].

El conocimiento de los efectos de distintos métodos físicos, químicos y biológicos sobre la estructura de una dada proteína es fundamental para predecir y mejorar su potencial aplicación como aditivo alimenticio [4]. Como ejemplos de estos métodos se pueden mencionar el tratamiento térmico, la glicosilación, la hidrólisis y la polimerización enzimática.

1.3. Proteínas lácteas

Tradicionalmente, los lácteos, carnes, huevos, cereales, legumbres y semillas oleaginosas han sido las principales fuentes de proteínas de los alimentos. Debido a la demanda de alimentos de la creciente población mundial se necesitan obtener proteínas provenientes de fuentes no tradicionales [4].

La leche es la secreción característica de los mamíferos y es producida para satisfacer las necesidades nutricionales y de defensa de los neonatos. El hombre la ha usado en su dieta durante 8000 años y se ha desarrollado una gran industria en torno a la transformación de la leche de algunas especies para la alimentación humana, especialmente la leche bovina [5]. A pesar de su amplio uso la leche bovina presenta un potencial alergénico relevante relacionado con la multiplicidad y diversidad de proteínas que presenta [6]. De la leche se obtiene una muy amplia gama de productos y subproductos entre los que se incluyen aproximadamente unas 1400 variedades de queso [5].

La leche es un fluido muy complejo cuyos componentes principales son agua, lípidos, azúcares (lactosa) y proteínas. Además, hay numerosos constituyentes menores, principalmente a nivel de trazas, por ejemplo minerales, vitaminas, hormonas, enzimas y compuestos diversos. La concentración de los principales componentes varía ampliamente entre las especies: lípidos, 2-55 %; proteínas, 1-20 % y lactosa, 0-10 % [5].

Las propiedades de la leche y la mayoría de los productos lácteos se ven más afectados por las proteínas que contienen que por cualquier otro componente. Las proteínas de la leche también tienen muchas propiedades únicas y debido a esto se han estudiado ampliamente y son probablemente el sistema proteico de alimentos mejor caracterizado [5].

1.3.1. Beta-lactoglobulina y proteínas del suero lácteo

Las proteínas precipitadas en la obtención del queso se conocen como caseínas. El suero líquido restante es una solución diluida de proteínas (aproximadamente 0,7 % en leche bovina), lactosa, sales orgánicas e inorgánicas, vitaminas y varios componentes a niveles de traza [5]. El suero lácteo fue durante mucho tiempo más bien un problema, dado su alto poder contaminante, en lugar de un producto de interés [7]. La fracción de proteína de suero lácteo es muy heterogénea e incluye como principales proteínas: β -

lactoglobulina (β -LG), α -lactoalbúmina (α -LA), inmunoglobulinas (Ig), albúmina sérica bovina (ASB) y numerosas proteínas minoritarias como lactoperoxidasa y lactotransferrina entre otras [5, 8]. Las técnicas de ultrafiltración, secado, etc se utilizan para obtener productos de gran aplicación en la industria de los alimentos como ser los concentrados de proteínas del suero WPC (por su denominación en inglés: *Whey Proteins Concentrate*) y los aislados de proteínas del suero WPI (por su denominación en inglés: *Whey Proteins Isolate*).

La β -LG representa el 50 % de las proteínas de suero (12 % de proteína total) en la leche bovina, no está presente en la leche humana y es generalmente considerada el principal alérgeno de la leche bovina [6]. La β -LG bovina consta de 162 residuos por monómero, con un peso molecular de 18 kDa y con un punto isoeléctrico cercano a un pH de 5,2. La molécula de β -LG (Figura 1.1) presenta una estructura tridimensional que consiste en ocho hebras de estructura en hoja plegada β (β -sheet por su denominación en inglés), dispuestas en forma antiparalela y enrollada de tal manera que forman un barril de cono aplanado, con un cáliz o bolsillo hidrofóbico. En el extremo carboxilo terminal se observa un segmento pequeño de estructura hélice α . Manteniendo la estructura terciaria de la molécula se encuentran cuatro de los cinco residuos de cisteína formando dos puentes disulfuro, 66-160 y 106-119, dejando la Cys121 con el tiol libre. Este puede ser responsable, a través de la formación de puentes disulfuro intramolecular, de la formación de agregados covalentes por calentamiento [9]. Aunque se conocen diez variantes genéticas (A-J) de β -LG bovino las más comunes son la A y B [10].

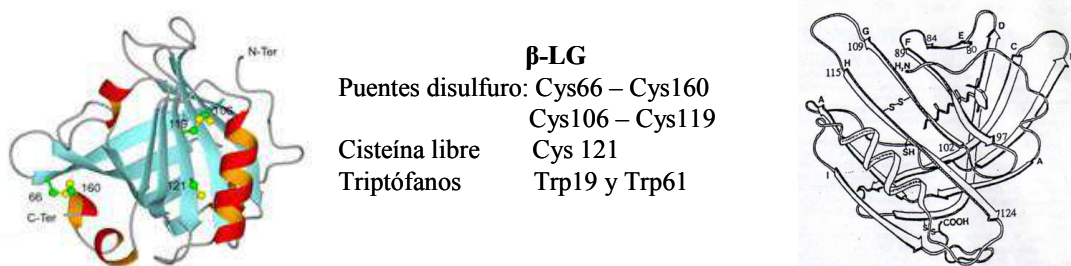


Figura 1.1: Estructura de la β -LG. (Tomado de “Desarrollo de un biorreactor con proteasas inmovilizadas para la hidrólisis limitada de proteínas del lactosuero y posterior análisis de las propiedades funcionales superficiales de los hidrolizados obtenidos” [11]).

1.4. Propiedades funcionales superficiales de las proteínas

Entre la interfase de un líquido y un gas se genera una tensión denominada tensión superficial (γ) y entre la interfase de dos líquidos inmiscibles se produce una tensión interfacial (γ_i). La variación de la energía libre de Gibbs (ΔG) está dada por $\gamma \cdot \Delta A$, donde ΔA es la variación del área superficial o interfacial. Durante la formación de espumas o emulsiones hay un aumento de área interfacial o superficial, con el consecuente aumento de la energía libre de Gibbs. De esto resulta que las emulsiones y las espumas son termodinámicamente inestables. Las sustancias tensoactivas son aquellas que por su naturaleza anfipática (o anfifílica) se adsorben en la interfase agua en aceite, aceite en agua o aire en agua y reducen la tensión interfacial o superficial [12].

Las proteínas contribuyen a las propiedades funcionales superficiales (espumado y emulsificación) por su naturaleza anfipática y contribuyen a formar y estabilizar las espumas o emulsiones tales como pan, merengue, helado, torta, margarina, mayonesa, leche, etc [13-15].

1.4.1. Migración y adsorción de las proteínas en las interfases

Para que una proteína disminuya la tensión superficial o interfacial primero debe migrar hacia la interfase. Excepto su solubilidad, la viscosidad de la solución, el tamaño y la hidrofobicidad superficial de la proteína influyen en sus velocidades de difusión y de adsorción en las interfases. En ausencia de energía exterior, la difusión es inversamente proporcional a su radio hidrodinámico y a la viscosidad de la solución [2].

El aumento de la hidrofobicidad superficial de la proteína disminuye su afinidad por la fase acuosa, migrando y adsorbiéndose más rápido en la interfase. Un tratamiento que aumente la hidrofobicidad, como el calentamiento moderado, puede mejorar las propiedades interfaciales de la proteína. Un calentamiento extenso puede exponer muchos sitios hidrofóbicos, disminuyendo su solubilidad y la capacidad superficial [2].

1.4.2. Formación de la capa interfacial

El contacto de la proteína con la interfase genera una apertura de la macromolécula. Los aminoácidos no polares se exponen en la fase oleosa y originan una capa proteica fuertemente adsorbida en la interfase. Los parámetros más importantes para que se establezca una capa cohesiva que estabilice las dispersiones son: flexibilidad

proteica, carga neta y balance de interacciones intra e intermoleculares localizadas en la interfase.

1.5. Emulsiones

Una emulsión es una dispersión coloidal de un líquido dentro de otro, en el cual es normalmente inmisible. La fase dispersa se obtiene rompiendo uno de los líquidos por medios mecánicos en pequeñas gotas que se distribuyen en la fase continua o dispersante [16]. Es un sistema termodinámicamente inestable debido a la elevada área interfacial creada que aumentando la tensión interfacial y genera un aumento de la energía libre de Gibbs [12].

Así, intentando facilitar el proceso de formación de las emulsiones, habitualmente se preparan con la ayuda de agentes emulsionantes o emulgentes. Estas sustancias son generalmente anfipáticas, con una parte lipofílica o hidrófoba (por ejemplo, una larga cadena alquílica) que se disuelve bien en la fase no acuosa y otra parte polar o hidrofílica, soluble en agua (grupos disociables, hidroxilos o poliglicoléter) ocupando la interfase y disminuyendo la tensión interfacial [17].

Las emulsiones alimentarias pueden ser productos tales como margarina y manteca, las cuales son emulsiones agua en aceite (W/O por su denominación en inglés: *water/oil*), o leche donde el agua es la fase continua, es decir una emulsión aceite en agua (O/W por su denominación en inglés: *oil/water*) [1]. El tamaño de las gotas que forman la fase dispersa de una emulsión está típicamente en el orden de magnitud comprendido entre 0,1 y 100 μm y confiere el aspecto blanco opaco a la mayor parte de las emulsiones [2].

1.5.1. Emulsificación y estabilidad

Al estudiar la estabilidad de una emulsión es importante distinguir entre estabilidad termodinámica y estabilidad cinética [18]. Como ya hemos visto las emulsiones son termodinámicamente inestables y eventualmente se separarán sus fases constituyentes. Por este motivo la diferencia en estabilidad cinética será la responsable de las propiedades presentadas por diferentes emulsiones [18].

La formación de una emulsión presenta uno o varios pasos tales como mezclado u homogeneización, dependiendo de los ingredientes desde los que se la desee formar y de los métodos elegidos para ello. Para crear una emulsión será necesario aportar

energía en forma de agitación mecánica (Figura 1.2). Termodinámicamente: la agitación mecánica del sistema por acción de un homogeneizador implica entrega de trabajo al sistema, lo que lleva a un aumento en su contenido de energía libre [17]

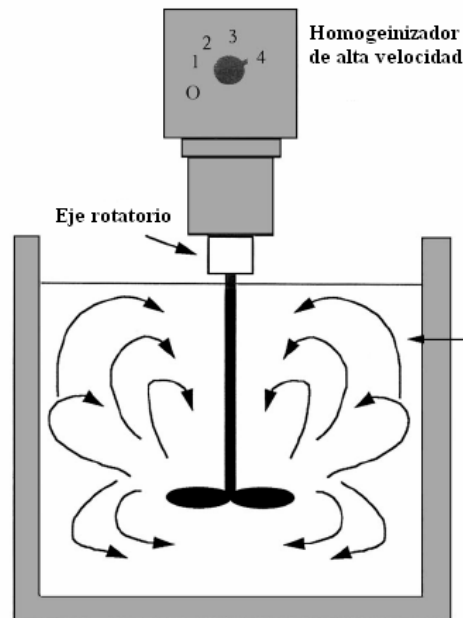


Figura 1.2: Homogeneizador de alta velocidad empleado para preparar emulsiones. (Tomado de “Propiedades fisicoquímicas y estructurales de estados no nativos de k-caseína bovina y su relación con propiedades de estabilización de emulsiones” [19])

El tipo de emulsión formada dependerá de las concentraciones de cada líquido: a altas concentraciones de aceite, tenderá a formarse una emulsión W/O, en tanto que a bajas concentraciones de aceite, la tendencia natural será la de formar una emulsión O/W. Las gotas formadas estarán en continuo movimiento e irán chocando entre sí para eventualmente agruparse y/o fusionarse. Además las gotas de mayor tamaño tenderán a disponerse finalmente en la parte superior del sistema debido a la diferencia de densidad. Es decir, el sistema tenderá a volver a su estado inicial de dos fases separadas (Figura 1.3).

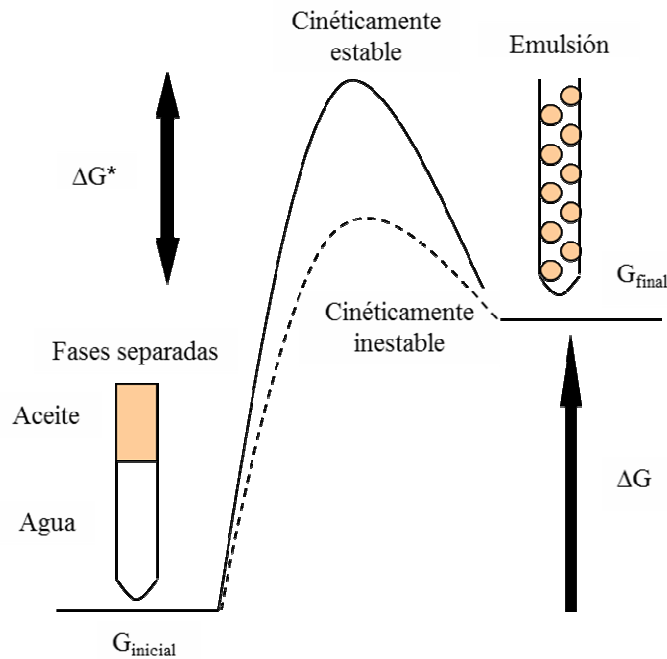


Figura 1.3: Sistema termodinámico de una emulsión. (Tomado de “*Food Emulsions*” [18])

A pesar de que toda emulsión es un sistema intrínsecamente inestable desde un punto termodinámico, aquellas que presentan una alta barrera de energía de activación (ΔG^*) serán emulsiones cinéticamente estables [18].

1.5.2. Mecanismos de desestabilización de las emulsiones

Los mecanismos físicos que conducen a la separación de fases son: cremado, floculación o agregado y coalescencia o fusión de gotas. Los mecanismos se definen a continuación:

Cremado: se debe al desplazamiento de las gotas de aceite en agua por efecto de la gravedad y conduce la formación de una capa concentrada en aceite por encima de la emulsión sin cambio en el tamaño de las gotas. Este fenómeno conduce, en un primer momento, al establecimiento de un gradiente vertical de concentración de gotas, pero seguidamente puede aparecer un límite distinto entre una capa superior de crema y una capa inferior reducida en gotas. En general el cremado es reversible ya que el reparto de las gotas en la fase dispersante puede revertirse por agitación suave [2].

Floculación o agregado: se debe a la tendencia de las gotas a reagruparse. En este mecanismo las gotas permanecen muy próximas durante un período prolongado sin que haya rotura de la película que las separa. La agregación de las gotas tiene como

consecuencia un incremento del tamaño aparente de las partículas y en la mayor parte de los casos conduce a una disminución de la estabilidad al cremado [2].

Para que una emulsión sea estable las fuerzas atractivas y repulsivas deben estar balanceadas. Estas son, en la teoría DLVO, las fuerzas atractivas de van der Waals y las fuerzas electrostáticas repulsivas [1]. La energía libre de interacción (G_T) es la suma de atracciones de van der Waals (G_W) y de repulsión electrostática (G_E) y presenta un perfil como el de la Figura 1.4.

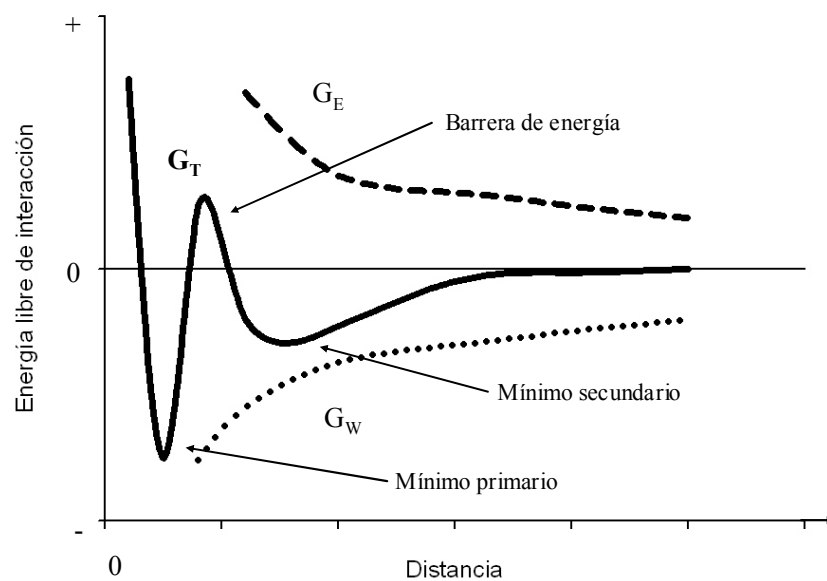


Figura 1.4: Variación de las energías potenciales en función de la distancia entre gotas. (Tomado de “Ciencia de los alimentos” [2])

Para G_T se observa la presencia de un máximo de energía potencial que es la barrera de energía que las gotas deben superar para lograr un acercamiento que lleve a la agregación. Si esta barrera es superada, las gotas se acercan y comienzan a prevalecer las fuerzas atractivas, evolucionando hacia un mínimo primario. El mínimo secundario está relacionado con la formación de flóculos pequeños, débiles, que se pueden romper por agitación suave.

Para un emulsionante iónico (tal como una proteína) adsorbido en la interfase líquido/líquido, deben estar presente en la fase continua iones de carga opuesta para estabilizar el sistema (Figura 1.5). Dichos iones van a rodear las gotitas cargadas y van a formar una doble capa eléctrica, la cuál va a detener el acercamiento evitando así la coalescencia [1].

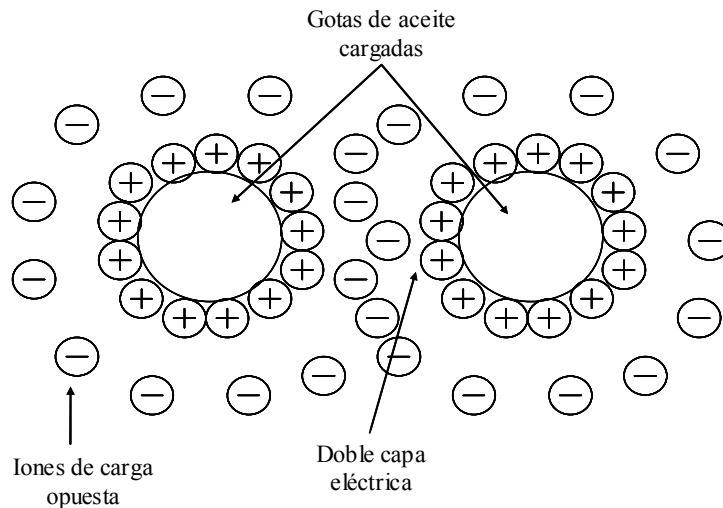


Figura 1.5: Diagrama esquemático de la estabilización electrostática (Tomado de “*Methods of testing proteins functionality*” [1])

El espesor de la doble capa eléctrica, conocida como la capa de Debye Hückel, es el factor más importante de las fuerzas repulsivas y decaen en forma exponencial con la distancia [1].

Las proteínas se alinean en la interfase y las regiones de la proteína que son predominantemente hidrofóbicas van a adoptar una posición en la fase oleosa, mientras que aquellas zonas que son más hidrofílicas tienden a acomodarse en la fase acuosa. Esto permite la exposición de restos de la proteína hacia el medio en forma de rulos y colas (Figura 1.6).

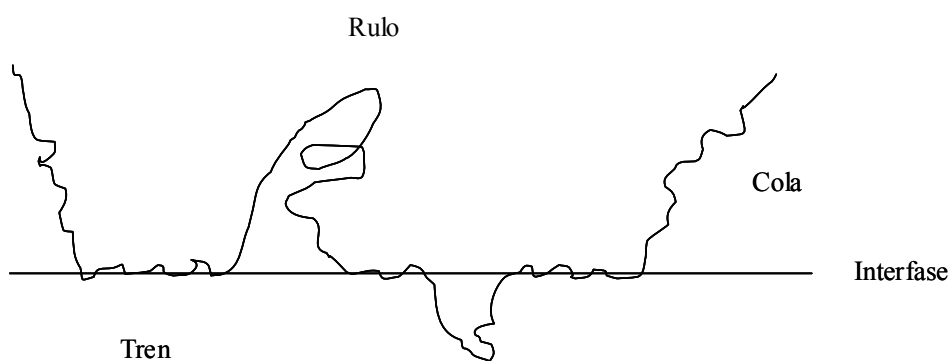


Figura 1.6: Representación esquemática de una proteína en la interfase (Tomado de “*Methods of testing proteins functionality*” [1])

A medida que las gotas se acercan, los rulos y colas de la proteína en la interfase comienzan a interactuar generando así la repulsión por efecto estérico (Figura 1.7).

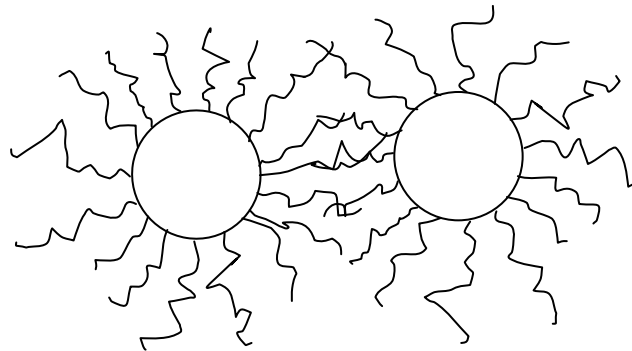


Figura 1.7: Efecto estérico debido a la adsorción proteica (Tomado de “*Methods of testing proteins functionality*” [1])

Coalescencia: es la fusión de dos gotas para formar una sola de mayor tamaño y es un proceso irreversible. La coalescencia puede ser causada por un retraso en la adsorción en la interfase o la desorción del agente emulsionante [2].

1.6. Espumas

Las espumas son dispersiones de gas en líquido o gas en sólido. En su forma más simple, una espuma consta de una burbuja de gas dispersa en una fase continua [3]. El gas que se utiliza en la mayoría de las espumas alimenticias es aire [16]. La espuma se compone de una fina pared líquida que separa dos burbujas que se denomina lámina, fase inter burbuja o película [2]. La zona de unión entre tres burbujas adyacentes se denomina borde de Plateau [3]. En la Figura 1.8 se representa la estructura de una espuma.

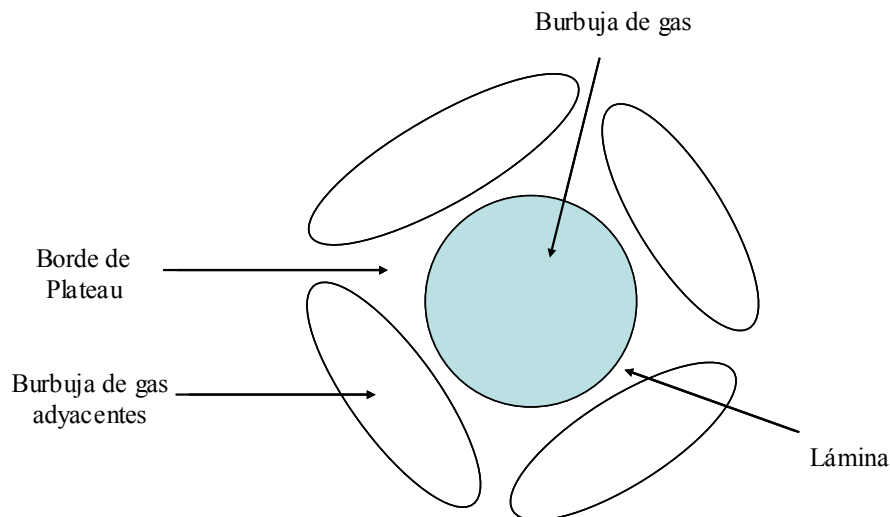


Figura 1.8: Estructura de una espuma (Tomado de “Ciencia de los alimentos” [2])

Jeantet y col [2] y Wagner [12] comparan las características diferenciales de las espumas y las emulsiones que hacen que las espumas sean sistemas más inestables que las emulsiones:

- El volumen de una burbuja en una espuma es mucho mayor que el volumen de una gota en una emulsión (diámetros de burbuja: 0,1 a 3 mm, gotas de emulsión: 0,1 a 100 μm)
- La tensión superficial, que en una burbuja de espuma es también mucho mayor que en la gota en una emulsión (γ_{espumas} es generalmente mayor a 30 mN m^{-1} , $\gamma_{\text{emulsiones}}$ 0,1 mN m^{-1})
- La diferencia de densidades entre fase continua y dispersa, que en espumas es igualmente mucho mayor que en emulsiones (la diferencia de densidades asciende hasta 1000 kg m^{-3} en espumas, llegando solamente hasta 100 kg m^{-3} en emulsiones).

Al igual que en la formación de una emulsión se debe aportar energía mecánica para formar la interfase líquido-gas. También se requerirá de agentes de superficie que disminuyan la tensión superficial para evitar la coalescencia de las burbujas de gas, logrando una mayor estabilidad de la espuma en el tiempo. Hay muchos alimentos que presentan espumas en su constitución: merengues, masas de panificación, helados, etc. [1].

1.6.1. Formación de espumas

Los principales métodos para la formación de espumas pueden separarse en: burbujeo, batido, agitación y vertido. El burbujeo, que es realizado en esta Tesis, involucra forzar el paso de gas a través del líquido vía aperturas en el material creando burbujas [1].

1.6.2. Estabilización de espumas

La estabilidad de una espuma está condicionada por: la tensión superficial y viscosidad de la fase continua, las propiedades de la película interfacial, la distribución del tamaño de burbuja, la temperatura y la naturaleza de la fase gaseosa. Los tres primeros factores tienen directa relación con la presencia de solutos en la fase acuosa (proteínas, azúcares, sales, etc.). El proceso de desestabilización de una espuma implica la tendencia de la fase gaseosa discontinua a formar una fase continua por aproximación y fusión de las burbujas. A este proceso se opone la presencia de la película proteica superficial que, como barrera mecánica, es tanto más efectiva cuanto mayor sea su viscoelasticidad y rigidez [17].

Jeantet y col [2] y Wagner [12] resumen los mecanismos implicados en el proceso de desestabilización de una espuma:

- Drenaje de líquido y desproporción: conduce al adelgazamiento de las películas y se debe al drenaje de solución que rodea a las burbujas por efecto de la gravedad. En las espumas poco densas las burbujas tienden a juntarse unas sobre otras, se deforman y se transforman en poliédricas y generan gradientes de presión entre las lamelas y los bordes de Plateau incrementando el flujo de líquido. El flujo se reduce con una fase líquida más viscosa y con una viscoelasticidad de interfase elevada.
- Flotación de las burbujas: causa la acumulación de las burbujas en la parte superior.
- Colapso de la espuma por ruptura de las láminas: se debe a que las láminas se debilitan por disminución de su espesor (principalmente por drenado) causando el colapso de la espuma.

En la Figura 1.9 se representan esquemáticamente los mecanismos de desestabilización de una espuma.

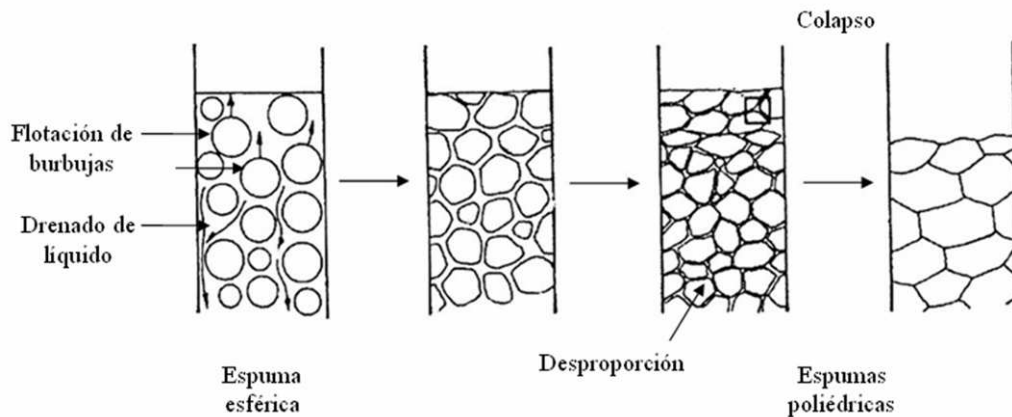


Figura 1.9: Representación esquemática de los procesos de desestabilización de una espuma y vista ampliada de la película inter-burbuja (Tomado de “Caracterización funcional y estructural de proteínas” [12]).

En la mayoría de los alimentos que involucran la presencia de espumas las proteínas son los agentes que logran la formación y estabilización de la fase gaseosa dispersa. Estas propiedades se deben a que las proteínas forman una barrera protectora elástica entre las burbujas de gas. En general, para la formación y estabilización de una espuma, la proteína tiene que ser rápidamente adsorbida en la interfase, por lo que debe difundir, penetrar y reordenarse en la misma. Por otro lado, para aumentar la estabilidad de la espuma, deberá formarse una película estable rodeando la burbuja de aire, con determinadas características reológicas (como viscoelasticidad). Para formar una película estable las proteína adsorbidas tienen que asociarse entre sí (ya sea por puentes disulfuro o por interacciones hidrofóbicas) para formar agregados de mayor tamaño, mínima carga superficial y alta capacidad de absorción de agua. La proteína deberá poseer ambos efectos: tensoactivo y formador de película al mismo tiempo para estabilizar más eficientemente a las espumas [12].

Belitz y col. [13] resumen las características de una proteína para formar y estabilizar espumas:

- Suficiente flexibilidad para adsorberse de forma irreversible a la interfase, exponer grupos reactivos y establecer interacciones intermoleculares (película cohesiva y continua)
- Suficiente rigidez para conservar estructuras secundarias en el interior de la proteína nativa (película viscoelástica)
- Bajo peso molecular para difundir con mayor velocidad
- Una pequeña carga neta (película espesa)

- Poca hidratación (película impermeable al aire)
- Buena solubilidad para permanecer en solución

1.7. Modificaciones proteicas y cambios en las propiedades funcionales superficiales

El procesamiento de alimentos puede alterar las propiedades nutricionales y funcionales de las proteínas. También puede modificar las propiedades alergénicas de las proteínas ocultando, destruyendo o exponiendo epítopos alergénicos a través de cambios en las estructuras proteicas [6]. Algunas operaciones en el procesamiento de los alimentos pueden ser desfavorables para la función de las proteínas como espumantes o emulsionantes, mientras que otros procedimientos pueden ser aplicados deliberadamente para favorecer esas funciones. Los tratamientos pueden ser físicos (calentamiento, altas presiones, etc.), químicos (reacción de Maillard, etc.) o enzimáticos (hidrólisis, entrecruzamiento, etc.).

Las propiedades funcionales se pueden estudiar en sistemas modelo que contienen una única proteína y partir del conocimiento del comportamiento y propiedades de estos sistemas modelos para luego continuar con sistemas más complejos. En este contexto el uso de soluciones de β -LG es apropiado para modelar el comportamiento de concentrados o aislados del suero lácteo.

En numerosos trabajos se ha examinado la relación entre las propiedades funcionales, la β -LG y tratamiento tales como calentamiento, reacción de Maillard e hidrólisis y entrecruzamiento enzimático [20-29].

1.7.1. Tratamiento térmico

El tratamiento térmico (calentamiento) de suspensiones de β -LG induce la desnaturalización y agregación de la proteína, modificando sus propiedades funcionales. A pH neutro la temperatura de transición es cercana a los 70 °C y luego de este cambio conformacional sigue un proceso de dimerización y polimerización. El cambio conformacional implica la exposición del residuo Cys, puentes disulfuro (Cys 106-119) y regiones hidrofóbicas generando monómeros de β -LG de alta reactividad y dando asociaciones por interacciones covalentes o hidrofóbicas [5, 30].

1.7.2. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática es la ruptura de enlaces peptídicos y en consecuencia la generación de péptidos más pequeños o aminoácidos. La composición final dependerá principalmente de la fuente proteica, del tipo de proteasa usada, de las condiciones de hidrólisis y del grado de hidrólisis alcanzado en la reacción.

Con respecto a los hidrolizados del suero lácteo estos se utilizan ampliamente en la tecnología alimentaria por sus propiedades nutricionales o funcionales [14]. En los hidrolizados de proteína se potencian diversas características funcionales, tales como baja viscosidad, mayor capacidad de agitación y dispersión y alta solubilidad.

La tripsina es producida por el páncreas y es una enzima específica ya que rompe al péptido en las posiciones del carboxilo de residuos Arginina (Arg) o Lisina (Lys). En la Figura 1.10 se muestra la estructura primaria de la β -LG, indicándose los 17 sitios susceptibles de ataque por parte de la tripsina [11].

Leu-Ile-Val-Thr-Gln-Thr-Met-Lys-Gly-Leu-Asp-Ile-Gln-Lys-Val-Ala-Gly-Thr-Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ala-Ser-Asp-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-Ala-Pro-Leu-Arg-Val-Tyr-Val-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu-Glu-Ile-Leu-Leu-Gln-Lys-Trp-Glu-Asn-Asp-Glu-Cys-Ala-Gln-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Glu-Lys-Thr-Lys-Ile-Pro-Ala-Val-Phe-Lys-Ile-Asp-Ala-Leu-Asn-Glu-Asn-Lys-Val-Leu-Val-Leu-Asp-Thr-Asp-Tyr-Lys-Lys-Tyr-Leu-Leu-Phe-Cys-Met-Glu-Asn-Ser-Ala-Glu-Pro-Glu-Gln-Ser-Leu-Val-Cys-Gln-Cys-Leu-Val-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Asp-Asp-Glu-Ala-Leu-Glu-Lys-Phe-Asp-Lys-Ala-Leu-Lys-Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg-Leu-Ser-Phe-Asn-Pro-Thr-Gln-Leu-Glu-Glu-Gln-Cys-His-Ile

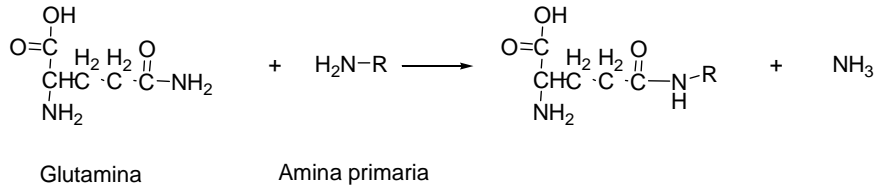
Figura 1.10: Estructura primaria de la β -LG. En rojo se indican la uniones entre aminoácidos capaces de ser atacados por la tripsina (Tomado de “Desarrollo de un biorreactor con proteasas inmovilizadas para la hidrólisis limitada de proteínas del lactosuero y posterior análisis de las propiedades funcionales superficiales de los hidrolizados obtenidos” [11]).

1.7.3. Polimerización enzimática

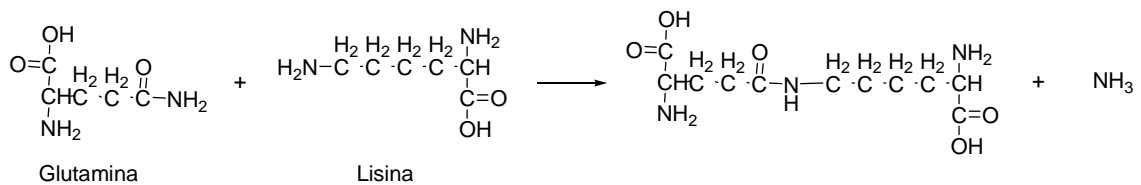
Las transglutaminasas son enzimas que catalizan la formación de enlaces peptídicos a través de la reacción de transferencia acídica entre un residuo de glutamina como donador y una amina primaria como receptor [4]. Cuando actúa la transglutaminasa sobre las proteínas, se realiza un entrecruzamiento intra e intermolecular por acción enzimática. La transglutaminasa puede modificar proteínas por medio de incorporación de aminas, entrecruzamiento y deaminación (Figura 1.11). Como resultado de estas reacciones son producidos polímeros de mayor peso molecular con cambios en las

propiedades funcionales dando la posibilidad de mejorar las propiedades reológicas y sensoriales de los alimentos [24, 31].

I)



II)



III)

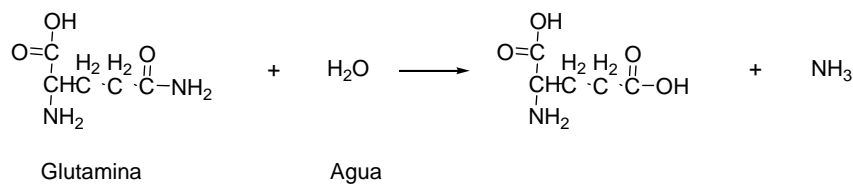


Figura 1.11: Esquema de reacción de transglutaminación. La transglutaminasa cataliza la transferencia acílica entre el grupo γ -carboxamida de glutamina (donador de acilo) y distintos aceptores de acilos: aminas primarias (I), por ejemplo la ϵ -amina de la lisina (II) y sin aminas puede catalizar la desaminación de glutamina con H_2O como el aceptor de acilo (III) (Tomado de “*Food Chemistry*” [13]).

La transglutaminasa es usada para mejorar la textura y modificar las propiedades funcionales de alimentos preparados, como mariscos, productos de surimi, fideos y productos lácteos. El entrecruzamiento proteico ha sido muy estudiado con algunas proteínas tales como caseínas, gluten, globulinas y proteínas de soja. Sin embargo, la polimerización de proteínas del suero lácteo ha sido poco estudiada, principalmente en su forma nativa [24]

1.7.4. Reacción de Maillard

La reacción de Maillard está siendo ampliamente estudiada durante los últimos años [25, 32]. Esta reacción, también conocida como glicosilación o pardeamiento no

enzimático, se produce con frecuencia durante el procesamiento industrial y hogareño para la mejora del color, aroma y sabor. Consiste en una condensación del azúcar reductor con el grupo ε-amino de los residuos lisil de las proteínas a través de la formación de iminas (base de Schiff) y el posterior reordenamiento de Amadori (Figura 1.12). A través de esta reacción la conjugación del azúcar a la proteína no requiere catálisis química sino solamente calentamiento con el fin de acelerar la reacción espontánea. Bien controlada la reacción de Maillard puede ser un buen método para el procesamiento de la proteína en la industria alimentaria [13, 32].

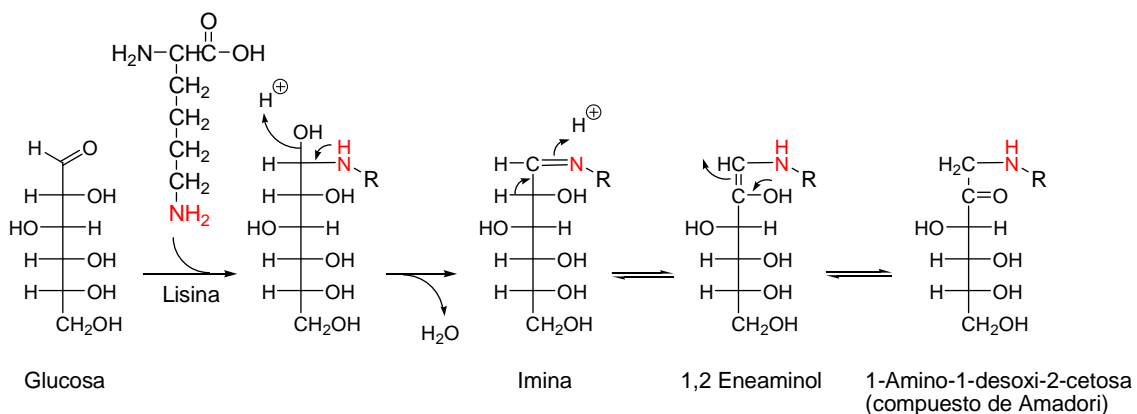


Figura 1.12: Esquema de la reacción de Maillard entre una molécula de lisina y una de glucosa. Primero se forma la imina (base de Schiff) y luego se realiza el llamado reordenamiento de Amadori (Tomado de “Food Chemistry” [13])

1.8. Caracterización estructural de la β-LG

1.8.1. Modelos de desnaturalización proteico

Un componente esencial en todo estudio termodinámico de estabilidad de proteínas es el modelo de desnaturalización. Este debe indicar los estados iniciales y finales (nativo y desnaturalizado), y la presencia o no de intermediarios. Para una proteína globular pequeña, como la β-LG, se describe generalmente por un modelo de dos estados:



Donde N y D representan los estados nativos y desnaturalizado de la proteína y solamente ellos tienen una concentración significativa en el equilibrio [33].

1.8.2. Estudio de la desnaturalización por espectroscopia en el UV

La espectroscopía UV es una técnica cuantitativa rápida, sensible y no destructiva utilizada en estudios de estructura y función de proteínas como complementos de técnicas más especializadas. En diversos trabajos se registró la diferencia en la absorbancia a 293 nm (que es una medida de la exposición de los residuos de Trp desde el interior de la proteína en desarrollo) y se representó como función de la temperatura desde 20 °C hasta 90 °C [33].

1.8.3. Determinación de la hidrofobicidad superficial por medidas de fluorescencia

Las medidas de fluorescencia intrínseca son una herramienta muy útil para el estudio estructural y la dinámica de las proteínas en solución. La fluorescencia intrínseca debida a la presencia de residuos Trp es particularmente sensible a los cambios de su microentorno, dando así posibilidades metodológicas para el estudio conformacional de las proteínas y los cambios producidos en los procesos de desnaturalización.

De las variadas modificaciones conformacionales que pueden darse en la desnaturalización proteica, cabe destacar la exposición de sitios hidrofóbicos que antes de la desnaturalización estaban ocultos y protegidos en la estructura proteica nativa más compacta. Es por esta razón que la medida de la hidrofobicidad superficial (HS) resulta útil en la estimación de la extensión del proceso de desnaturalización y es un instrumento para predecir las propiedades funcionales a consecuencia de los cambios conformacionales.

El contenido de aminoácidos hidrofóbicos y su ubicación en la estructura proteica juega un rol determinante en el comportamiento funcional de las proteínas. Si bien estos aminoácidos tienden a localizarse en el interior de la estructura molecular, protegidos del medio acuoso circundante, impedimentos estéricos hacen que no todos ellos se ubiquen en el interior de la proteína, quedando total o parcialmente expuestos y generando así, sectores apolares superficiales [34]. La extensión de estas zonas hidrofóbicas superficiales determina la HS de la proteína, que define su mayor o menor afinidad con otras moléculas. Este parámetro determina la solubilidad, la interacción con otras proteínas o lípidos, la adsorción a interfases y las propiedades funcionales de la proteína en estudio [33].

1.8.3.1. Efecto de la desnaturalización proteica sobre la hidrofobicidad superficial

La conformación proteica puede ser afectada por diferentes factores como: temperatura, pH, concentración, fuerza iónica y presencia de burbujas de aire, partículas de grasa o moléculas desnaturalizantes. El desenrollado de la estructura proteica, por desnaturalización química o térmica, expone grupos hidrofóbicos (tanto aquellos que contienen restos aminoácidos alifáticos como aromáticos) que se hallaban ocultos y protegidos en la estructura proteica nativa compacta. Es por esto que la medida de la HS resulta útil en la estimación de la magnitud del proceso de desnaturalización.

Si bien la desnaturalización puede provocar en las proteínas del suero de leche una serie de efectos indeseados debido a la disminución de solubilidad que trae aparejada, puede también producir un mejoramiento de las propiedades funcionales superficiales. Así, un requerimiento básico para el estudio de las propiedades funcionales de las proteínas del suero de leche es conocer el estado conformacional en un medio particular.

1.8.3.2. Estudio de la desnaturalización por extinción de la fluorescencia intrínseca de la β -LG con acrilamida

En el presente trabajo se utilizó un método sencillo para determinar la extensión de la desnaturalización de β -LG midiendo la extinción de la fluorescencia intrínseca de dichas proteínas al adicionar cantidades crecientes de acrilamida (Figura 1.13). El diferente grado de exposición de los residuos hidrofóbicos Trp puede ser evaluado siguiendo la extinción de la fluorescencia intrínseca de las proteínas al agregar solutos que funcionen como extintores de fluorescencia, como por ejemplo la acrilamida.

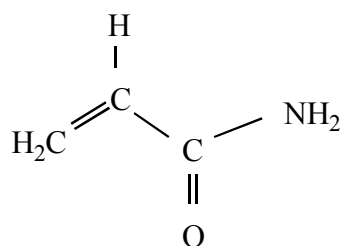


Figura 1.13: Molécula de acrilamida utilizada como extintor de la fluorescencia intrínseca en la determinación de la extensión de la desnaturalización de la β -LG.

1.8.4. Dicroísmo circular

La técnica espectroscópica conocida como Dicroísmo Circular (DC) se basa en la medida de la absorción de la luz polarizada y brinda información sobre la conformación de una macromolécula en solución.

En la región del UV cercano, los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de Triptofano (Trp), Tirosina (Tyr) y Fenilalanina (Phe). Ya que la asimetría en estos grupos químicos se debe exclusivamente a su entorno, y como los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la macromolécula, los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína, es decir se relacionan con su estructura terciaria. Además, las señales en esta región son extremadamente sensibles a los cambios en la conformación. Así, los cambios en las interacciones intermoleculares o aquellos consecuencia de modificaciones en el entorno, pueden ser detectados a través de cambios en las señales en el espectro de la proteína en el UV cercano [28].

Los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano reflejan en gran medida la estructura secundaria de las proteínas. Las estructuras secundarias hoja β y hélice α muestran picos de DC por debajo de 200 nm y mínimos en la región de 200 a 235 nm, mientras que por su parte la estructura ovillo estadístico presentan profundas depresiones cerca de los 200 nm [35].

1.8.5. Viscosidad intrínseca.

De las técnicas que proveen información sobre la forma de las macromoléculas las medidas de viscosidad son muy utilizadas debido a su simple equipamiento y la facilidad de uso.

La viscosidad es una medida de la resistencia de un fluido a fluir. Considerando una proteína dispersa en agua, la resistencia a fluir de la solución varía con el tamaño, conformación y concentración.

1.8.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

El análisis de la movilidad de una muestra proteica ante la aplicación de un campo eléctrico es útil para obtener información acerca del peso molecular de las proteínas, distinguir moléculas por su carga neta o su conformación, detectar cambios

en su composición aminoacídica y/o separar cuantitativamente distintas especies moleculares.

La electroforesis en geles de poliacrilamida en medio desnaturizante (SDS-PAGE) es una de las técnicas más ampliamente utilizada para separación y caracterización de proteínas. La movilidad electroforética de una proteína básicamente depende de su carga neta, su tamaño y conformación. Al realizar las corridas electroforéticas en SDS, éste se fija a las proteínas, dotándolas así de una densidad de carga superficial aproximadamente igual, por lo que las variables que influirán en su movilidad serán su conformación y tamaño molecular. Los geles de poliacrilamida son soportes interactivos, que actúan como tamices ayudando a la separación de la muestra sembrada.

1.9. Caracterización de las propiedades funcionales de la β -LG

1.9.1. Estudio de las emulsiones

El término actividad emulsionante da idea del área interfacial creada. Los distintos métodos actuales de determinación de esta propiedad difieren en la técnica empleada para medir o estimar esta área interfacial, la cual puede ser: por turbidimetría (Pearce y Kinsella), por microscopía óptica y electrónica o por contador de tamaño de gotas.

1.9.1.1. Estudio de las emulsiones por turbidimetría

El método más ampliamente usado por su sencillez es el descrito por Pearce y Kinsella [36] que determina la actividad emulsionante con una medida turbidimétrica. El fundamento de este método es que la turbidez producida por una dispersión de partículas es proporcional al área interfacial.

1.9.1.2. Estudio de las emulsiones por análisis de tamaño de gota

Las propiedades organolépticas, termodinámicas y cinéticas de las emulsiones están relacionadas con el tamaño de gotas de las mismas. Por ello es crucial lograr la determinación de la distribución de tamaño de gota a través de métodos sencillos, rápidos y reproducibles.

Tanto las emulsiones naturales como las elaboradas artificialmente por métodos simples se caracterizan por tener un tamaño de gotas que varían en un rango de tamaño, siendo denominadas como emulsiones polidispersas. Es posible fabricar emulsiones monodispersas, pero estas requieren de métodos de homogeneización más sofisticados.

En emulsiones monodispersas basta solamente un parámetro para caracterizarlas, siendo éste el radio (R) o el diámetro (D), pero en el caso de las polidispersas el diámetro de las gotas está comprendido entre un valor mínimo y un máximo. Por lo tanto, para el análisis del tamaño de gota de las emulsiones alimentarias es conveniente referirse en términos de una distribución de tamaños de partícula (o gota). El procedimiento a seguir será el de dividir la escala de tamaños en varios rangos más pequeños y discretos, detallando el número de gotas que entran dentro de cada rango. Los resultados pueden presentarse en tablas o mediante histogramas. En la práctica es más conveniente e informativo presentar los datos como una frecuencia de tamaños en número, longitud, superficie o volumen.

La Figura 1.14 muestra los resultados obtenidos por difracción láser de la distribución de tamaño de gotas para las emulsiones preparadas con β -LG. Los tamaños de gotas observadas fueron mayores a 1 μm , tamaños para el que se ha demostrado que el cremado es el proceso desestabilizador más importante [18].

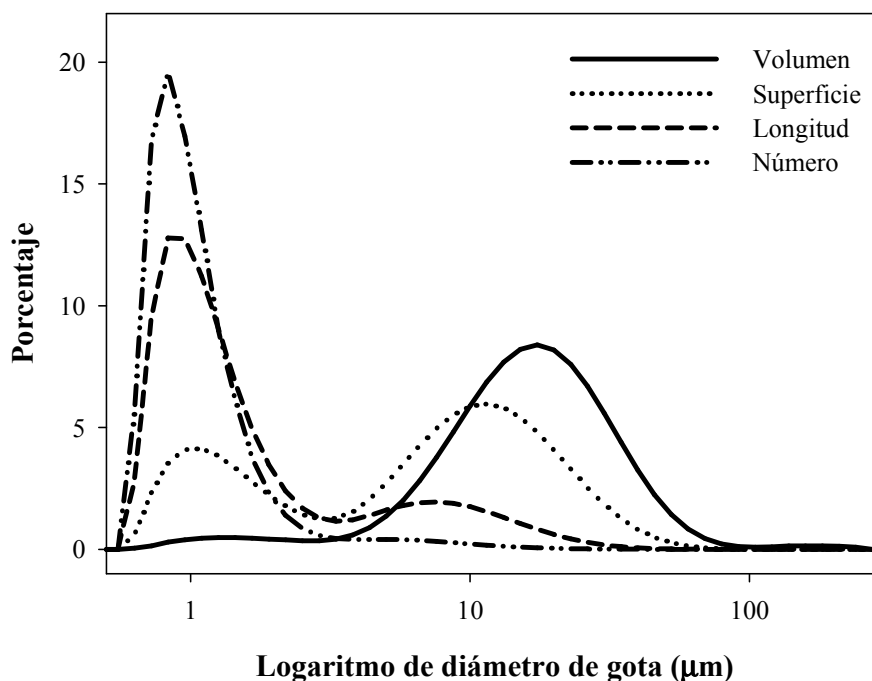


Figura 1.14: Distribución de tamaño de gotas en volumen, superficie, longitud y número.

Resulta útil aclarar que la forma de la función de distribución de tamaño varía apreciablemente según esta sea presentada como una distribución en número o en volumen. El volumen de una gota es proporcional al D^3 y por lo tanto una distribución en volumen presentará un sesgo hacia las gotas de gran tamaño, mientras que una distribución en número lo hará hacia las de pequeño tamaño.

La cantidad de picos que presente el gráfico de una distribución de tamaños de partícula es lo que la define como monomodal (presenta un pico), bimodal (presenta dos picos principales) y multimodal (más de dos picos).

1.9.2. Estudio de las espumas

Para estudiar las propiedades espumantes de una proteína, el primer paso es preparar la solución en condiciones definidas de concentración proteica, pH y fuerza iónica. El desarrollo de la espuma se realiza por incorporación de aire, CO_2 o N_2 , por medio de batido, agitación, inyección, burbujeo o sobresaturación.

El método de burbujeo en columna tiene las siguientes ventajas: permite utilizar un volumen pequeño de solución (menor a 20 mL) y baja concentración de proteína (menor a 0,5 %), tiene muy buena reproducibilidad, volumen y caudal de aire controlables, volumen de burbujas más homogéneo, el colapso es relativamente insignificante y permite el control y regulación de la temperatura. El burbujeo de gas se puede realizar a través de un único orificio o de un vidrio fritado (el más usado: tipo G4 de 5-154 μL). Se pueden variar las condiciones iniciales de espumado: volumen y concentración de solución (2 a 400 mL, 0,01 a 0,5 % de proteína), dimensiones de columna donde se desarrolla la espuma (diámetro: 0,5 a 5 cm y largo desde 30 cm a 1 m), caudal de gas (2 mL min^{-1} a 2 L min^{-1}), tiempo (8 s a 10 min), y se puede trabajar a volumen de espuma máximo fijado (tiempo variable de espumado) o a tiempo fijo de burbujeo.

Es de esperar que una solución proteica que se presente como un buen agente espumante logre hacer más espuma y que además esta perdure más tiempo como tal. Un método sencillo para realizar la evaluación de la capacidad espumante y el seguimiento de la evolución de la espuma a través del tiempo, es decir para estimar su estabilidad, es simplemente medir las alturas de la espuma en el tiempo.

1.10. Objetivos

La presente Tesis tiene como objetivos generales mejorar las propiedades funcionales superficiales (emulsificación y espumado) de la beta-lactoglobulina modificada por tratamientos físicos, químicos y biológicos y estudiar los cambios estructurales ocurridos en la proteína.

Objetivos específicos

- Modificar la beta-lactoglobulina por tratamiento térmico, hidrólisis enzimática con tripsina, polimerización enzimática con transglutaminasa y glicosilación (reacción de Maillard).
- Medir las propiedades espumantes y/o emulsificantes de la beta-lactoglobulina modificada por los tratamientos anteriormente mencionados.
- Analizar los cambios estructurales producidos en la beta-lactoglobulina por medidas de espectroscopía UV, extinción de la fluorescencia, dicroísmo circular, viscosidad intrínseca y electroforesis.
- Vincular los cambios estructurales detectados con los cambios en las propiedades funcionales de la proteína en cuestión.

2. Materiales y Métodos

2.1. Reactivos químicos

Las drogas utilizadas en este trabajo fueron, en la mayoría de los casos, de calidad pro-análisis. En general se prepararon soluciones stock de cada una de las drogas y, cuando fue necesario, se las valoró antes de utilizarlas.

2.2. Soluciones de uso general

2.2.1. Solución reguladora fosfato 20 mM pH 6,8

Se preparó tomando 1,36 mL de H₃PO₄ (Merck, Argentina) concentrado (85 % P/P y 1,7 g mL⁻¹) y diluyendo con 800 mL con agua destilada. El pH se ajustó con agregados de NaOH (Cicarelli, Argentina) 0,1 M y llevando a un volumen final de 1 L. Todos las soluciones reguladoras fosfato fueron almacenados a 4 °C y al abrigo de la luz.

2.2.2. Solución reguladora fosfato 50 mM pH 7,0 y pH 6,8

Se preparó tomando 3,39 mL de H₃PO₄ (Merck, Argentina) concentrado (85 % P/P y 1,7 g mL⁻¹) y diluyendo con 800 mL con agua destilada, el pH se ajustó con agregados de NaOH (Cicarelli, Argentina) 0,1 M y llevando a un volumen final de 1 L.

2.2.3. Solución reguladora Tris-HCl 50 mM pH 7,0 y pH 8,0

Se preparó pesando 12,127 g de Trisma base (Sigma Chemical Co, USA) y se llevó a 800 mL disolviendo con agua destilada. El pH se ajustó con agregados de HCl (Anedra, Argentina) 0,1 M y luego fue llevado a un volumen final de 1 L con agua destilada.

2.2.4. Solución de β-LG

Se utilizó β-LG AB bovina (Sigma Chemical Co, USA) de diferentes concentraciones en solución reguladora fosfato a distintos pHs. En la mayoría de las experiencias se preparó solución de β-LG 25 mg mL⁻¹.

2.2.5. Solución de Tripsina

Se preparó pesando 30 mg de tripsina y diluyendo a 1 mL de HCl (Anedra, Argentina) 0,1 mM.

2.2.6. Solución de SDS estabilizante de emulsiones

Se preparó pesando 1 g de SDS (Merck, Alemania) (concentración final 0,1 %) y 5,9 g de NaCl (Cicarelli, Argentina) (concentración final 0,1 M) y se llevó a 1 L disolviendo con solución reguladora fosfato 20 mM pH 6,8.

2.2.7. Solución de acrilamida

Se preparó pesando acrilamida (Sigma Chemical Co, USA) y se disolvió en solución reguladora fosfato 20 mM pH 6,8 para lograr una concentración final de acrilamida 5 M.

2.2.8. Solución de urea

Se preparó pesando urea (Merck, Alemania) para preparar una solución madre de urea 9 M en solución reguladora fosfato 50 mM pH 6,8. Las diluciones en el rango comprendido entre 0 M a 8 M se obtuvieron diluyendo la solución madre de urea 9 M con solución reguladora fosfato 50 mM pH 6,8.

2.2.9. Solución de cisteína

Se preparó pesando cisteína (Sigma Chemical Co, USA) y se disolvió en agua destilada para obtener una solución madre de 1,25 M de concentración.

2.3. Equipos utilizados

2.3.1. Medidas espectroscópicas

Las medidas espectrofotométricas en el espectro ultravioleta (UV) y visible se realizaron en espectrofotómetros Spekol 1200 y Jasco V-550, todos equipados con portacubetas termostatzables. Las medidas consistieron en obtención de espectros de absorción, lecturas de absorbancia (A) y turbidez (τ) a una longitud de onda (λ) fija.

2.3.2. Medidas espectrofluorométricas

Las medidas espectrofluorométricas se realizaron en Aminco Bowman Serie 2-Luminescence Spectrometer.

2.3.3. Homogenizador

Homogenizador manual OMNI International modelo GLH-220 equipado con soporte y caja externa reguladora de velocidad de 4.000 a 25.000 rpm.

2.3.4. Liofilizador

La deshidratación por liofilización se realizó por medio de un Liofilizador Liotop L101 (Liobras, Brasil) equipado con condensador y bomba de vacío.

2.3.5. Conductímetro

HORIBA modelo D-24 (Kyoto, Japón). Los valores de conductividad fueron almacenados automáticamente en una computadora conectada al conductímetro.

2.3.6. Peachímetro

HORIBA modelo D-24 (Kyoto, Japón). La calibración del electrodo de pH se efectuó con soluciones reguladoras estándar de pH 4,0 y 7,0 teniendo en cuenta la temperatura de trabajo.

2.3.7. Equipos varios

Se utilizaron baños termostáticos, centrifugas, agitadores magnéticos, cuba y soportes de acrílico para electroforesis Mini-PROTEAN 3, rectificador y fuente de poder estabilizada Chemar S.A.C.I.F. CHF 1.4., micropipetas Oxford, BOECO 921, V3-series (High Tech. Lab.), Wheaton 851303 y Hamilton 171 ORN.

2.3.8. Programas de computación

Spectra Manager 1.30.00, Jasco Corporation. Sigma Plot 10, Systat Software Inc. Microsoft® Office Word 2003, Microsoft Corporation. Microsoft® Office Excel 2003, Microsoft Corporation. STATGRAPHICS Centurión, StatPoint Technologies, Inc. EndNote X3, Thomson Reuters.

2.4. Tratamientos realizados a la β -LG

2.4.1. Tratamiento térmico

Soluciones de β -LG 25 mg mL⁻¹ en solución reguladora fosfato 50 mM, pH 6,8, fueron calentadas a 85 °C en baño termostático durante 1, 3, 5, 7, 10 y 15 min, respectivamente. Cumplido el tiempo correspondiente, las muestras fueron rápidamente enfriadas a temperatura ambiente y reservadas para los análisis posteriores.

2.4.2. Tratamiento transglutaminasa en presencia de cisteína

Se trabajó con β -LG 25 mg mL⁻¹ en solución reguladora fosfato 50 mM pH 8,0. Se colocó 1 mL de solución de β -LG en tubos eppendorf y se agregó Cys hasta tener una concentración final de 0,07 M [37]. Luego de 10 min se adicionó TG hasta obtener un nivel de 1 U g⁻¹ de sustrato [38] y se incubaron a 40 °C en baño termostático durante 30, 60, 120 y 180 min. La reacción se detuvo por calentando de las muestras por 15 min a 60 °C en baño termostático [39].

2.4.3. Tratamiento transglutaminasa en presencia de cisteína y posterior hidrólisis con tripsina a pH 8,0

Se trabajó con β -LG 25 mg mL⁻¹ en solución reguladora fosfato 50 mM pH 8,0. Se colocó 1 mL de solución de β -LG en tubos eppendorf y se agregó Cys hasta tener una concentración final de 0,07 M [37]. Luego de 10 min se adicionó TG hasta obtener un nivel de 1 U g⁻¹ de sustrato [38] y se incubaron a 40 °C en baño termostático durante 20, 60 y 100 min siguiendo el diseño experimental [31, 39-40]. La reacción se detuvo por calentando de las muestras por 15 min a 60 °C en baño termostático [39]. Luego se les adicionó tripsina hasta obtener una relación E/S de 1:167 [11] y se incubaron a 37 °C en baño termostático durante 30, 60 y 90 min. La reacción se detuvo con 5 min a 80 °C [41].

2.4.4. Glicosilación y tratamiento térmico

La β -LG glicosilada (GLI- β -LG) se obtuvo partiendo de una mezcla de β -LG y glucosa (Sigma Chemical Co, USA), relación molar 1:100, incubándose a 50 °C durante 96 h bajo humedad relativa de 65 % (solución saturada de KI).

Una solución de β -LG 25 mg mL⁻¹ en solución reguladora fosfato 50 mM, pH 6,8, fue calentada a 85 °C en baño termostático durante 3 min (HT- β -LG). A una parte de HT- β -LG se le adicionó glucosa (Sigma Chemical Co, USA) hasta obtener una relación molar 1:100. Luego fue liofilizada e incubada a 50 °C durante 96 h bajo humedad relativa de 65 % (solución saturada de KI). La muestra así obtenida se la designó como HT-GLI- β -LG: tratamiento térmico y posterior glicosilación de la β -LG. Finalmente fue re-disuelta en solución reguladora fosfato.

También fueron preparadas diferentes muestras como control: i) β -LG_{control} (β -LG calentada en seco, 96 h a 50 °C, y en ausencia de glucosa) y ii) HT- β -LG_{control} (HT- β -LG calentada en seco, 96 h a 50 °C).

Todas las muestras fueron liofilizadas y reservadas para su posterior análisis.

2.5. Métodos

2.5.1. Determinación del grado de hidrólisis

Se determinaron los grupos α -amino libres por reacción con el ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) [42]. Este método es un ensayo espectrofotométrico del cromóforo formado por la reacción del TNBS con las aminas primarias (Figura.2.1). La reacción se lleva a cabo bajo condiciones levemente alcalinas y se detiene con la disminución brusca del pH.

El grado de hidrólisis (GH) se expresa en mg de L-Leucina (L-Leu), aminoácido estándar elegido por Adler-Nissen, y se obtiene por comparación con los mg de L-Leu que representan el 100 % de hidrólisis de la β -LG.

Para obtener la curva estándar de L-Leu, a 500 μ L de buffer fosfato 212,5 mM, pH 8,2, se les agregaron 500 μ L de solución de TNBS al 0,1 % en agua destilada y volúmenes crecientes de solución estándar de L-Leu 880 mM en SDS al 1 %. Los tubos fueron cubiertos con papel de aluminio para evitar su exposición a la luz y llevados a baño termostático a 50 °C, durante 1 h. Cumplido el tiempo de incubación, los tubos se retiraron del baño y se detuvo la reacción por agregado de 1 mL de HCl 0,1 N. Alcanzada la temperatura ambiente, cada tubo fue llevado a un volumen de 4,0 mL con agua destilada. Luego de homogeneizar la muestra se determinó Abs₃₄₀, contra blanco de reactivos. Se graficó mg de L-Leu vs. Abs₃₄₀.

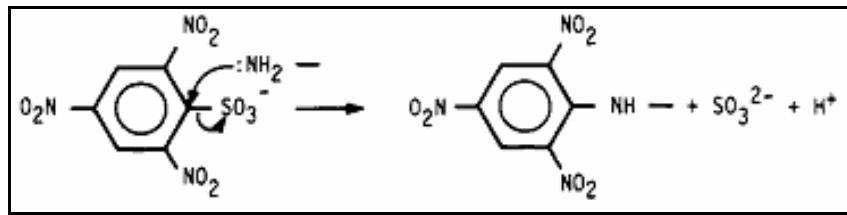


Figura 2.1: Reacción del TNBS con grupos aminos. (Tomado de “Desarrollo de un biorreactor con proteasas inmovilizadas para la hidrólisis limitada de proteínas del lactosuero y posterior análisis de las propiedades funcionales superficiales de los hidrolizados obtenidos” [11]).

Para determinar la masa de β -LG, expresada en mg de L-Leu que represente el 100 % de hidrólisis, se procedió de la siguiente forma: 10 mg de β -LG y 4 mL de HCl 6 N se mantuvieron a 110 °C durante 24 h. Finalizado el tiempo de reacción y alcanzada la temperatura ambiente, se ajustó el pH a 8,2. Se aplicó el método del TNBS a varias alícuotas de la muestra. Aquella muestra cuya absorbancia permitió trabajar en el rango de la curva estándar de L-Leu, fue elegida como representativa del 100 % de hidrólisis.

Para obtener el GH de muestras incógnitas se procedió a aplicar el método del TNBS a alícuotas de muestras que contuvieran la misma masa que la elegida como representativa del 100 % de hidrólisis.

La curva estándar de L-Leu permitió expresar los valores de Abs_{340} registrados, para cada muestra incógnita, como mg de L-Leu. Con estos datos y el del 100 % de hidrólisis se obtuvo el GH porcentual para cada muestra analizada.

2.5.2. Electroforesis

Se realizaron electroforesis de β -LG tratada SDS-PAGE siguiendo la metodología descrita por Laemmli [43]. El gel de corrida se prepara con acrilamida (Sigma Chemical Co, USA) (15 % P/V), bis-acrilamida (Sigma Chemical Co, USA) 0,5 % P/V, ambas disueltas en solución reguladora de Tris (2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol)-HCl 0,38 M, pH 8,8. Los reactivos se mezclan y se los somete al proceso de desgaseado colocándolos dentro de un desecador al que se le aplica vacío con una bomba. Una vez desgaseados, se les agrega una solución de SDS para lograr una concentración final de SDS de 0,5 % V/V y se inicia la reacción de polimerización por incorporación de 50 μ L de $(NH_4)_2S_2O_8$ 20 mg mL^{-1} (preparado inmediatamente antes de su utilización) y 5 μ L de N,N,N',N'-tetrametiletiléndiamina (TEMED). Esta mezcla se vuelca cuidadosamente entre las placas de vidrio preparadas para la electroforesis, evitando la presencia de burbujas en el estado final, y se cubre con isobutanol, para

esperar a la polimerización del gel. Por simple volcado se elimina el isobutanol antes agregado. En la parte superior del gel de corrida se dispone el llamado gel de empaquetamiento (*stacking* en inglés), compuesto por solución de acrilamida (10 % P/V), bis-acrilamida 0,15 % P/V, ambas disueltas en solución reguladora Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, a las que se agregan: solución de SDS para lograr una concentración final de SDS de 0,5 % V/V, 50 μL de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 10 % P/V y 10 μL de TEMED. Se ubica el dispositivo conocido con el nombre de “peine” a fin de que al gelificar queden generados los canales (o “calles”) donde se sembrarán las muestras. Una vez polimerizado el gel de empaquetamiento y retirado el “peine” cuidadosamente, la placa así armada se monta en la cuba electroforética.

Los compartimientos de los electrodos se llenan con solución de corrida (Tris 0,025 M, Glicina 0,2 M y SDS 0,1 %). Posteriormente se siembran las muestras en los canales del gel de empaquetamiento utilizando una jeringa Hamilton. La concentración de proteína sembrada generalmente fue de $1 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$, sembrando 20 μL en cada “calle”. Un canal se reserva para hacer correr en él un patrón de pesos moleculares. Al conectar los electrodos, se comienza la corrida electroforética a una intensidad de corriente constante de 15 mA. Finalizada la corrida electroforética, se desmonta la placa, se separan cuidadosamente los vidrios que la contenían, retirando el gel de entre ellos. La coloración del gel se realizó con una solución de azul brillante coomasie y la posterior decoloración con sucesivos lavados con agua a 60 °C.

Partiendo de soluciones de 25 mg mL^{-1} de β -LG tratada se tomaron alícuotas que contenían 500 μg de proteína y se llevaron a un volumen final de 500 μL con solución reguladora para muestra, dando así una solución de siembra con una concentración de $1 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$.

Las muestras para electroforesis fueron calentadas a 90 °C por 5 minutos. Luego de enfriar a temperatura ambiente las alícuotas fueron frías a -20 °C hasta su uso. La solución reguladora para muestra (solución madre) se preparó con: 3,55 g de agua, 1,25 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 2,5 mL de glicerol, 2 mL de SDS 10 %, 0,2 mL de solución azul de bromofenol 0,5 %. Finalmente se agregó 9,5 mL de agua

2.5.2.1. Análisis de geles:

Los geles obtenidos una vez finalizado todo el proceso fueron escaneados usando el programa Scan Jet 5p Hewlett-Packard. Para cuantificar las intensidades relativas de las bandas obtenidas se utilizó un software que permite establecer una

cuantificación en base a las densidades relativas de píxeles de las imágenes obtenidas. Los pesos moleculares de cada banda proteica fueron comparados con los estándares conocidos de referencia.

2.5.3. Determinación de la hidrofobicidad superficial por medidas de fluorescencia

Las determinaciones de hidrofobicidad superficial se realizaron según Busti y col. [7, 33]. 3 mL de cada muestra proteica se titularon con solución de acrilamida 5 M, registrándose en el espectrofluorómetro las intensidades de fluorescencia ante el agregado de sucesivas alícuotas de solución de acrilamida 5 M, con una longitud de onda de excitación de 295 nm y de emisión de 337 nm. Se consideró como intensidad de fluorescencia inicial (F^0) a la obtenida con la muestra antes del primer agregado de acrilamida. El rango de concentraciones de extintor abarcado en la técnica fue de 0 a 0,2 M, concentraciones que no hicieron necesaria una corrección por la absorción debida a la acrilamida. Los resultados obtenidos se representaron en un gráfico de Stern-Volmer (F^0/F vs. concentración de acrilamida). La ecuación de Stern-Volmer relaciona la disminución de la intensidad de fluorescencia con la concentración del agente extintor de fluorescencia, Q. La forma apropiada de esta ecuación al analizar la extinción de fluorescencia para una muestra proteica heterogénea es:

$$\frac{F^0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] \quad (2.1)$$

Donde: K_{SV} es la constante de Stern-Volmer para la extinción dinámica de la fluorescencia; [Q]: concentración del agente extintor.

2.5.4. Estudio de la desnaturalización de la β -LG. Modelos de desnaturalización.

Si asumimos un modelo de dos estados sólo estarán presentes en concentraciones significativas en solución las formas nativa y desnaturalizada [33]. Por lo tanto:

$$1 = F_N + F_{des} \quad (2.2)$$

Donde F_N y F_{des} representan la fracción del total de proteína en estado nativo y desnaturalizado, respectivamente.

Para una dada concentración de urea (desnaturalización química) o temperatura (desnaturalización térmica) se cumple:

$$Y = Y_N \times F_N + Y_{des} \times F_{des} \quad (2.3)$$

Donde Y es cualquier parámetro observable elegido para el seguimiento de la desnaturalización. Y_N e Y_{des} , representan los valores de Y característicos para la proteína nativa y desnaturalizada, respectivamente. Combinado las ecuaciones 2.2 y 2.3 resulta:

$$F_{des} = \frac{(Y_N \times Y)}{(Y_N \times Y_{des})} \quad (2.4)$$

La constante de equilibrio K_D y el cambio de energía libre ΔG_D para la reacción de desnaturalización se puede calcular según:

$$K_D = \frac{F_{des}}{(1 - F_{des})} \quad (2.5)$$

$$\Delta G_D = -R \times T \times \ln K_D = -R \times T \times \ln \left(\frac{F_{des}}{(1 - F_{des})} \right) \quad (2.6)$$

Si ΔG_D varía en forma lineal con la concentración de urea se puede extrapolar a valor cero para obtener ΔG_D^0 la cual corresponde al valor de energía libre para el proceso de desnaturalización en dos estados en ausencia de urea.

2.5.5. Desnaturalización química de la β -LG seguida por medidas de fluorescencia. Determinación del λ_{max} de emisión y extinción de la fluorescencia intrínseca con acrilamida.

Distintas soluciones de urea fueron preparadas a partir de una solución madre 9 M en solución reguladora fosfato 50 mM pH 6,8. A 3 mL de las soluciones de urea se les agregó una alícuota de solución de β -LG hasta obtener una concentración final de 0,13 mg mL⁻¹ de proteína. Se incubaron las soluciones durante 10 min a 25 °C.

Cada solución se introdujo en una cubeta de cuarzo para fluorimetría, de paso óptico 1 cm. Se recogieron los espectros de emisión de cada solución (excitación a 295 nm) en busca del λ_{max} de emisión correspondiente (Figura 2.2).

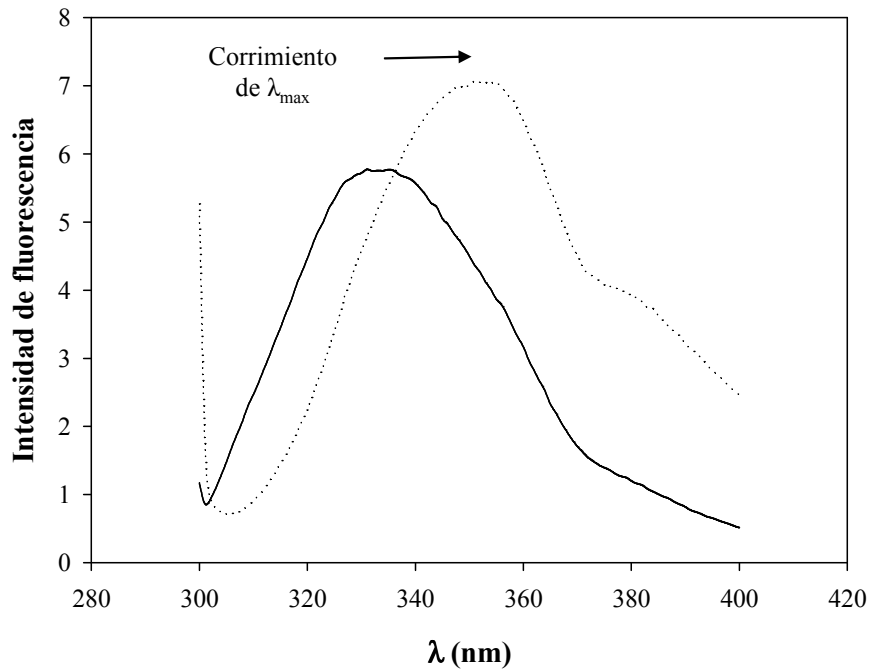


Figura 2.2: Espectros de emisión de fluorescencia de β-LG nativa (—) y β-LG desnaturada (····) a una longitud de onda de excitación de 295 nm. Se observa un corrimiento del λ_{\max} de emisión hacia mayores longitudes de onda (corrimiento al rojo).

Se determinó posteriormente la intensidad de fluorescencia a λ_{\max} denominándose a ese valor F° . La variación de los distintos λ_{\max} con la concentración de urea sigue una forma sigmoidea simple de acuerdo con la pérdida de la estructura nativa y la mayor exposición de los Trp internos al solvente, cambios que provocan un desplazamiento al rojo del máximo de emisión de fluorescencia.

A continuación se añadieron sucesivas alícuotas de solución madre de acrilamida 5 M a cada muestra de β-LG/urea contenida en la cubeta de lectura, hasta obtener una concentración de 0,2 M de acrilamida. Después de cada agregado de acrilamida y posterior agitación se determinó la intensidad de fluorescencia a λ_{\max} , F . Al finalizar estas experiencias se obtienen como datos: λ_{\max} vs. [urea] y F°/F vs. [acrilamida] (Gráficos de Stern-Volmer) para cada concentración de urea ensayada.

Se ha demostrado que la β-LG se disocia sin alterar la exposición al solvente de los residuos de Trp. Por lo tanto, para la desnaturación de la β-LG seguida por medidas de λ_{\max} de fluorescencia, F_{des} puede calcularse y así obtener los perfiles de desnaturación química (F_{des} vs. [urea]) [33, 44].

2.5.6. Desnaturalización térmica de la β -LG seguida por medidas de absorbancia en el UV

Las curvas de desnaturalización térmica se siguieron por espectrofotometría diferencial en el UV utilizando un espectrofotómetro de doble haz (Jasco V-550). Para el control de la temperatura de trabajo, el equipo cuenta con una celda termostatazada por efecto Peltier que controlada por una unidad programable (Jasco ETC-505 T) permite el calentamiento a través de gradientes lineales de temperatura.

3 mL de solución de β -LG 0,2 % P/V en solución reguladora fosfato 50 mM pH 6,8 se introdujeron en una cubeta para espectrofotometría de paso óptico de 1 cm, mientras que en la de referencia se colocó igual volumen de la solución reguladora. La cubeta de medida fue fabricada a partir de una cubeta de cuarzo a la que se adaptó un cabezal de acrílico para evitar la evaporación de la muestra.

La diferencia de absorbancia a 293 nm, ΔAbs_{293} , fue medida en función de la temperatura en el rango comprendido entre 20 a 90 °C. Se utilizó una rampa de temperatura de 1 °C min⁻¹. El compartimento del espectrofotómetro se purgó continuamente con una corriente de nitrógeno para evitar la condensación de agua sobre las paredes de las cubetas.

La disociación de los dímeros de β -LG en monómeros no produce cambios en ΔAbs_{293} , ya que el grado de exposición de los residuos Trp al solvente es el mismo tanto para el dímero como para el monómero [33, 44].

2.5.7. Análisis estructural por medidas de viscosidad intrínseca.

El incremento de la viscosidad de una solución proteica, η_i , se calcula con:

$$\eta_i = \eta_r - 1 \quad (2.7)$$

η_r es la viscosidad relativa determinada por:

$$\eta_r = \frac{\eta_s}{\eta_0} = \frac{\rho_s \cdot t_s}{\rho_0 \cdot t_0} \quad (2.8)$$

η_0 , ρ_0 y t_0 son la viscosidad, densidad y el tiempo de drenado del solvente, mientras que η_s , ρ_s y t_s son la viscosidad, densidad y tiempo de drenado de la solución proteica. Sobre la base de la ecuación de Huggins:

$$\frac{\eta_i}{C} = [\eta] + k \cdot [\eta]^2 \cdot C \quad (2.9)$$

C es la concentración de proteína (g mL^{-1}). La viscosidad intrínseca, $[\eta]$, se determina por extrapolación de la gráfica de η_i/C versus C. La viscosidad intrínseca es una medida del volumen hidrodinámico que ocupa una molécula y puede relacionarse con parámetros conformacionales propios de la macromolécula como el volumen específico (v_2). De esta manera puede expresarse en el límite cuando la concentración tiende a cero:

$$[\eta] = v \times v_2 \quad (2.10)$$

Donde v es el factor simha o de forma relacionado con la simetría de la molécula que adquiere un valor mínimo de 2,5 para moléculas esférica [27].

El volumen específico parcial anhidro, $v_{2,\text{anh}}$, se calcula graficando densidad de soluciones proteicas a diferentes concentraciones. A bajas concentraciones, y si la relación es lineal, se obtiene la ordenada al origen (h) y la pendiente (m), calculándose $v_{2,\text{anh}}$ como:

$$v_{2,\text{anh}} = \frac{1 - m}{h} \quad (2.11)$$

$v_{2,\text{anh}}$ es el volumen que ocupa 1 g de proteína seca y se relaciona con el grado de compactación de la misma. Para proteínas compactas $v_{2,\text{anh}}$ está comprendido entre 0,6 y $0,75 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$.

La viscosidad intrínseca fue determinada con un viscosímetro capilar tipo Ostwald en un baño de temperatura controlada ($25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$).

Para determinar la viscosidad relativa de cada solución fueron medidos el tiempo de drenaje de soluciones de β -LG tratadas (t_s) a cinco concentraciones diferentes entre 10 y 60 mg mL^{-1} . El tiempo de drenado del solvente puro (t_0) fue de 89,44 s. La densidad de cada solución (ρ_s) fue medida usando un densímetro digital (Anton Paar modelo DMA35N). La viscosidad relativa se calculó a través de la ecuación 2.8 y la viscosidad intrínseca por extrapolación de la gráfica de η_i/C versus C. $v_{2,\text{anh}}$ se determino aplicando la ecuación 2.11 con los datos h y m de la gráfica de ρ_s versus C.

Las muestras analizadas fueron: β -LG (proteína nativa), β -LG-Cys (proteína reducida con cisteína), TG- β -LG (proteína reducida con cisteína y tratada con transglutaminasa 60 min) y HT- β -LG (proteína calentada 3 min a $85 \text{ }^\circ\text{C}$). Las medidas fueron hechas por triplicado.

2.5.8. Dicroísmo circular (DC):

Las soluciones de β -LG sometidas a tratamiento fueron estudiadas a través de la técnica de dicroísmo circular (DC). Se utilizó un espectropolarímetro (Jasco J-810, Japón) registrándose las medidas automáticamente con un tiempo de integración de 2 s y un ancho de banda de 2 nm. Se realizaron cuatro repeticiones de las medidas a una velocidad de 50 nm min^{-1} y se promediaron a la λ correspondiente. Para las experiencias en el UV lejano se trabajó en un rango de λ de entre 190 y 250 nm y para las del UV cercano, entre 250 y 320 nm; se emplearon sendas celdas de camino óptico de 0,1 y 1 cm, respectivamente. Las concentraciones proteicas fueron de $25 \text{ }\mu\text{M}$ para el UV lejano y $164 \text{ }\mu\text{M}$ para el UV cercano. Las proteínas fueron diluidas a partir de las concentraciones iniciales utilizando solución reguladora fosfato 20 mM, pH 6,8.

Los datos obtenidos de las experiencias de DC se reportaron como “elipticidad molar media por residuo”: $[\theta]_{\text{MRW}}$ ($\text{grado} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$).

$$[\theta]_{\text{MRW}} = \frac{\theta}{10 \cdot C \cdot l \cdot n} \quad (2.12)$$

Donde: θ es la elipticidad (miligrados); C la concentración de la muestra (M); l el camino óptico (cm) y n el número de aminoácidos (para la β -LG, de peso molecular aproximado 18300 Da, usando un promedio del peso de los residuos aminoacídicos de 113 g, el valor de n es aproximadamente 162).

2.5.9. Determinación de grupos amino disponibles

La cantidad de grupos amino disponibles se determinó por el método colorimétrico basado en la reacción de O-ftaldialdehído (OPA) de acuerdo con el trabajo de Wooster y col. [45]. El reactivo OPA fue preparado por disolución de 80 mg de OPA en 2 mL de etanol, que se mezcló con 5 mL de SDS 10 % P/V, 0,2 mL de 2-mercaptoetanol y se diluyó a 100 mL con tampón de bórax 0,1 M pH 9,9. El ensayo consistió en mezclar 3 mL de reactivo OPA con 50 μL de solución de proteína (10 mg mL^{-1}), incubar 30 min a temperatura ambiente y luego medir absorbancia a 340 nm. Además, se realizó una curva de calibración empleando L-leucina como estándar. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

2.5.10. Ultrafiltración

Luego de la glicosilación la glucosa remanente (sin reaccionar) fue extraída por ultrafiltración usando membranas de corte de polietersulfonato de 5 kDa (AMICON). La separación se realizó con agitación suave insuflando N₂ a una presión de 2 bares.

La concentración de glucosa luego de ser ultrafiltrada se cuantificó por el método de glicemia enzimática esquematizado en la Figura 2.3 (Glicemia enzimática, Método enzimático para la determinación de glucosa en suero o plasma, Wiener lab. Rosario-Argentina):

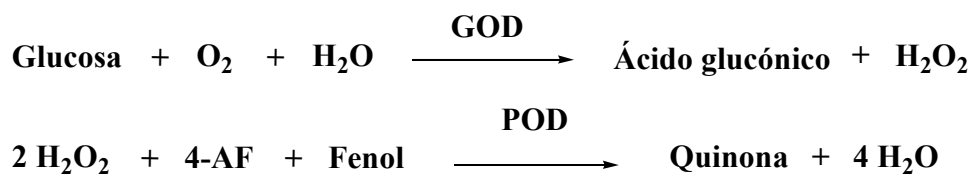


Figura 2.3: Reacciones del método de glicemia enzimática.

Siendo GOD y POD las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa respectivamente y 4-AF el reactivo 4-aminofenazona. La quinona se cuantifica por medidas espectrofotométricas a una longitud de onda de 505 nm. La ultrafiltración se detuvo hasta obtener una concentración de salida de glucosa menor a 0,005 mg mL⁻¹ (concentración inicial de glucosa = 24,5 mg mL⁻¹).

La curva de calibración de glucosa se realizó diluyendo convenientemente una solución de glucosa de 1 g L⁻¹ de concentración con 2 mL de reactivo de glicemia enzimática. Este reactivo de glicemia enzimática se preparó con 3,5 mL de reactivo 4-AF, 3,5 mL de fenol y 210 µL de mezcla de enzimas GOD/POD. Las mezclas de glucosa y reactivo de glicemia enzimática se incubaron durante 10 min a 37 °C y luego se midió absorbancia a una longitud de onda de 505 nm.

La determinación de glucosa a la salida de la ultrafiltración se realizó tomando alícuotas de la solución de salida de la ultrafiltración, cuya concentración de glucosa se desea determinar, y se llevó a 2 mL con el reactivo de glicemia enzimática. Las mezclas de glucosa y reactivo de glicemia enzimática se incubaron durante 10 min a 37 °C y luego se midió absorbancia a una longitud de onda de 505 nm. Utilizando la curva de calibración se determinó la concentración de glucosa a la salida de la ultrafiltración. La ultrafiltración se detuvo hasta obtener una concentración de salida menor a 0,005 mg mL⁻¹.

2.5.11. Determinación de las propiedades emulsionantes

Las propiedades emulsionantes se pueden clasificar en principio en dos grupos según sobre que proceso dan información: proceso de formación de la emulsión (poder emulsionante) o proceso de desestabilización de la emulsión (poder estabilizante).

2.5.11.1. Preparación de las emulsiones

Se prepararon por homogenización mecánica (OMNI International modelo GLH-220) de 3 mL de las muestras acuosas del sustrato proteico en cuestión (β -LG nativa o tratada), de concentración 0,1 % P/V en solución reguladora fosfato 50 mM pH 7,0, con 1 mL de fase lipídica a 20.000 rpm durante 30 s. Como fase lipídica se utilizó aceite de maíz comercial (Cocinero 100 % Puro de Maíz-Molinos Río de la Plata SA). El equipo de preparación de las emulsiones se muestra en la Figura 2.4.



Figura 2.4: Equipo para la preparación de las emulsiones. Las mismas se realizaron por homogenización mecánica de la mezcla aceite/solución proteica en tubos Falcon.

2.5.11.2. Estudio de las emulsiones por turbidimetría

Según la teoría de Mie de la dispersión de la luz existe una relación entre la turbidez (τ) de una solución que contiene partículas esféricas con el radio y el número de esas partículas:

$$\tau = K \cdot \pi \cdot a^2 \cdot N \quad (2.13)$$

Donde K es el coeficiente de difusión de la luz, a, el radio medio de la partícula y N el número de partículas.

Pearce y Kinsella definieron la actividad emulsionante como el área interfacial creada y estabilizada por una concentración dada de proteína y la expresaron a través de un “índice de actividad emulsionante” (IAE), de modo que a mayor actividad emulsionante de una proteína, mayor será su IAE correspondiente. Las unidades del IAE son $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$. En el presente trabajo se calculó el IAE de acuerdo a:

$$\text{IAE} = \frac{2 \cdot \tau}{\phi \cdot C} \quad (2.14)$$

Donde ϕ es la fracción de volumen de fase aceite y C es concentración de proteína en la emulsión (1 mg mL^{-1}). Para la presente Tesis $\phi = V_{\text{FL}}/V_{\text{TE}} = 1 \text{ mL}/4 \text{ mL} = 0,25$. Siendo V_{FL} : el volumen fase lipídica y V_{TE} : el volumen total de la emulsión.

Por otro lado,

$$\phi = \frac{\pi \cdot a^3 \cdot N}{V_{\text{TE}}} \quad (2.15)$$

Relacionando las ecuaciones 2.13, 2.14 y 2.15 resulta:

$$\text{IAE} = \frac{3 \cdot K \cdot V_{\text{TE}}}{2 \cdot a \cdot C} \quad (2.16)$$

Dado que la turbidez está definida como:

$$\tau = \frac{2,303 \cdot A}{l} \quad (2.17)$$

Donde A es la absorbancia a 500 nm y l es el camino óptico (0,01 m). Combinando las ecuaciones 2.13 y 2.17, el índice de actividad emulsionante se calcula según la expresión:

$$\text{IAE} = \frac{4.606 \cdot A}{1 \cdot \phi \cdot C} \quad (2.18)$$

Para estimar la estabilidad de las emulsiones ante el cremado y la floculación se aplica Pearce-Kinsella, en el que se extraen alícuotas de las emulsiones a distintos tiempos después de preparada la emulsión, recibidas en solución de estabilizante a las cuales se les mide la absorbancia a 500 nm.

De la emulsión formada según protocolo 2.5.11.1 se tomaron alícuotas de 20 μL y fueron llevadas a 5 mL con solución estabilizadora. Dichas alícuotas fueron tomadas desde el fondo del tubo con el uso de una pipeta Hamilton como se detalla en la Figura 2.5. Luego se midió absorbancia a 500 nm contra blanco de emulsión.



Figura 2.5: Tubo Falcon adaptado para la extracción de alícuotas de las emulsiones obtenidas.

2.5.11.3. Estudio de las emulsiones por análisis de tamaño de gota

Inmediatamente después de la homogeneización se tomaron 780 μl de cada emulsión y se examinaron mediante un analizador de tamaño de partículas (Figura 2.6) Mastersizer 2000 por difracción de rayos láser (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido).

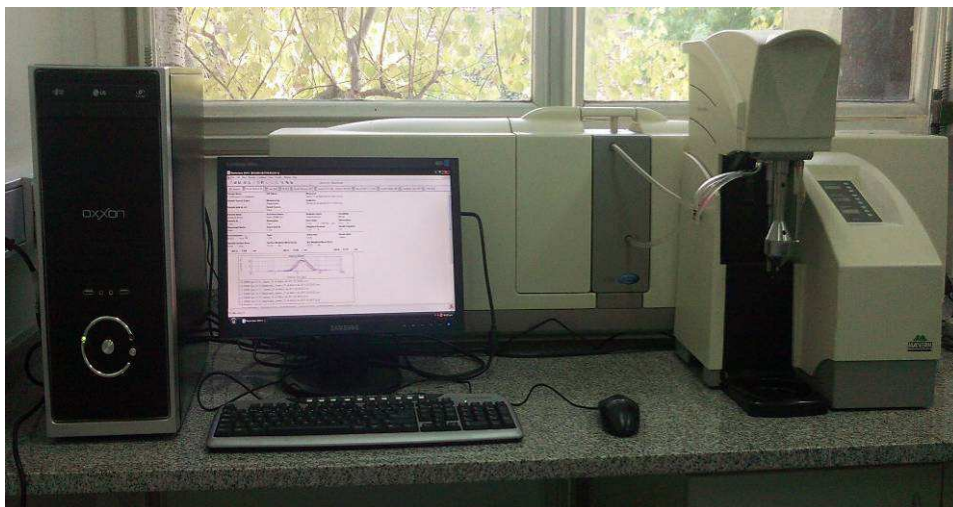


Figura 2.6: Analizador de tamaño de partícula de la Universidad Nacional de Quilmes.

Existen diversas maneras de expresar el tamaño medio de gota. Según se considere la longitud, la superficie o el volumen, se generan diferentes diámetros medios. En esta Tesis el diámetro medio se expresó mediante $D[4,3]$ determinada a través de:

$$D[4,3] = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (2.19)$$

Donde d_i es el diámetro de la i -ésima partícula (n_i).

2.5.11.4. Separación de fases de las emulsiones

La separación de fases, u *oiling off* (por su nombre en inglés), es la liberación o separación del aceite y es determinado por observación directa del aceite separado de la emulsión (Figura 2.7). El ensayo de estabilidad a la separación de fases se realiza por comparación de la extensión de la cantidad de aceite separado de la emulsión de las distintas muestras.



Figura 2.7: Separación de fases u *oiling off*. En la parte inferior se encuentra la “fase acuosa”, la cual es una emulsión con menor proporción de gotas de aceite. En la mitad se encuentra la “fase crema” de abundante gotas de aceite. Sobre esta última se halla la fase aceite separada de la emulsión.

Para este ensayo se registró fotográficamente con una cámara digital (Olympus DS-580 de 4,0 mega píxeles) la separación de fases de las emulsiones a los 15 días luego de su formación, en estado de reposo, al abrigo de la luz y una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$.

2.5.12. Evaluación de las propiedades espumantes

Desde el punto de vista conceptual el parámetro que mide la actividad espumante (también llamado capacidad espumante) de una proteína debe reflejar su habilidad para incorporar aire en la solución en forma de una distribución fina de burbujas. Mientras que para la estabilidad espumante de una proteína el parámetro debe reflejar la habilidad de retener gas por un cierto período de tiempo

Las espumas se formaron usando un aparato de burbujeo llamado espumómetro (Figura 2.8). El espumómetro cuenta con un disco poroso de vidrio sinterizado en su base, a la que se le adaptó un catéter por el que se puede insuflar nitrógeno. Adosada a la columna de acrílico, se colocó una escala graduada en cm, a fin de poder realizar el seguimiento de la altura de la espuma formada con el tiempo. Cabe destacar que, tal como se observa en la Figura 2.8, en la base y en la parte superior del espumómetro se adaptaron sendos electrodos para realizar determinaciones de conductimetría con las espumas formadas. El espumómetro consiste en una columna de acrílico de 20 cm de longitud y 3,5 cm de diámetro.



Figura 2.8: “Espumómetro”. La manguera celeste proviene del dispositivo esquematizado en la Figura 2.9.

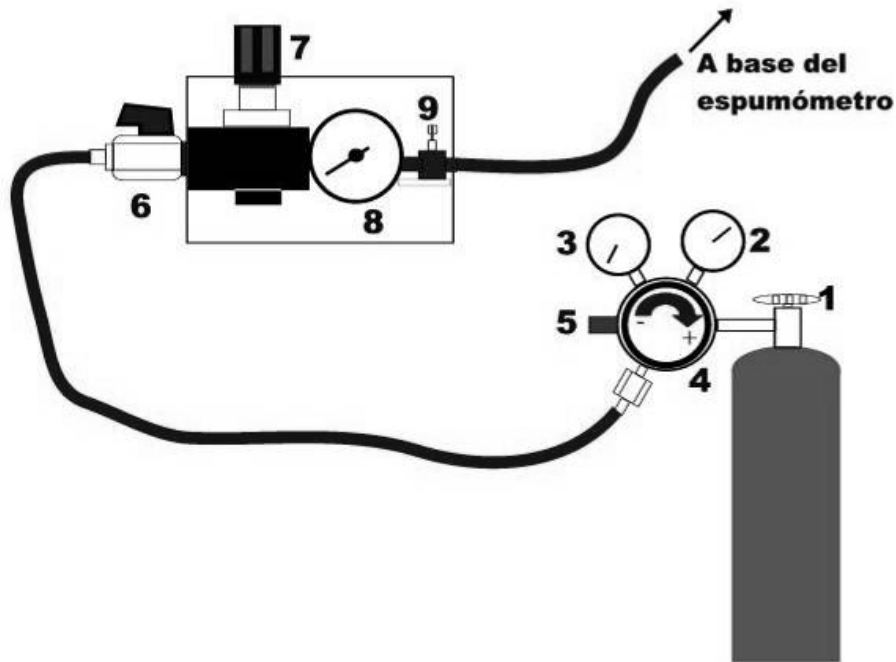


Figura 2.9. Los elementos constitutivos de este equipo son: 1. llave de paso del tanque de gas nitrógeno; 2. manómetro de presión del tanque; 3. manómetro de presión de salida; 4. llave reguladora de la presión de 3; 5. válvula de seguridad; 6. llave exclusiva; 7. regulador del manómetro de presión de trabajo; 8. manómetro de presión de trabajo; 9. micro válvula.

Las muestras a espumar se diluyeron a 0,1 % P/V en solución reguladora fosfato 20 mM pH 6,8. Las determinaciones se realizaron en el espumómetro cuyo cilindro está equipado con dos pares de electrodos, un par situado en la base de la columna y el otro en la mitad del tubo, y con un disco poroso en el fondo a través del cual entra el aire, con un caudal de 5 mL s^{-1} , y fue forzado a pasar a través del líquido, formando la espuma. El volumen inicial de solución a espumar (V_{ini}) fue de 10 mL. El burbujeo se detuvo cuando la espuma alcanzó un volumen fijo de 115 mL (V_{Emax}). Durante la prueba se registran: i) la conductividad de la solución (Figura 2.10), ii) la conductividad de la espuma (Figura 2.12) y iii) el volumen de espuma, en una computadora y una cámara digital Olympus DS-580 4 mega píxeles.

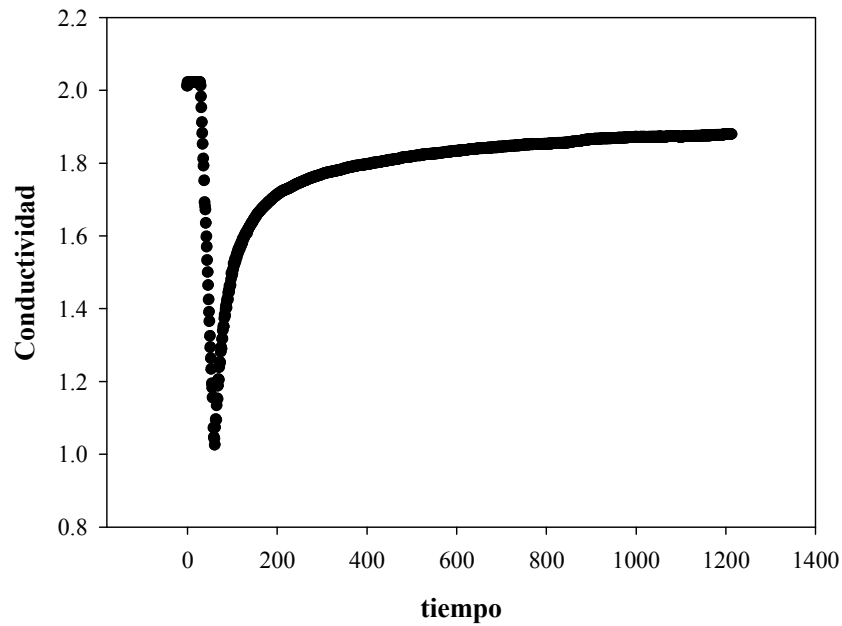


Figura 2.10: Forma típica de las curvas de conductividad de la solución espumada en el tiempo. Las unidades de conductividad y tiempo son arbitrarias. La conductividad inicial está dada por el volumen de solución inicial. Al comenzar el espumado la conductividad disminuye en forma lineal hasta un mínimo en cuyo tiempo se detiene el espumado y luego del cual la conductividad aumenta debido al drenado de líquido desde la espuma hacia la solución

Las mediciones de conductividad de la solución a espumar en el tiempo (C_t) y con referencia a una conductividad inicial (C_{ini}) se utilizarán para calcular el volumen de líquido en la espuma (V_{LE}) de la Figura 2.11 [28]:

$$V_{LE} = V_{ini} [1 - C_t / C_{ini}] \quad (2.20)$$

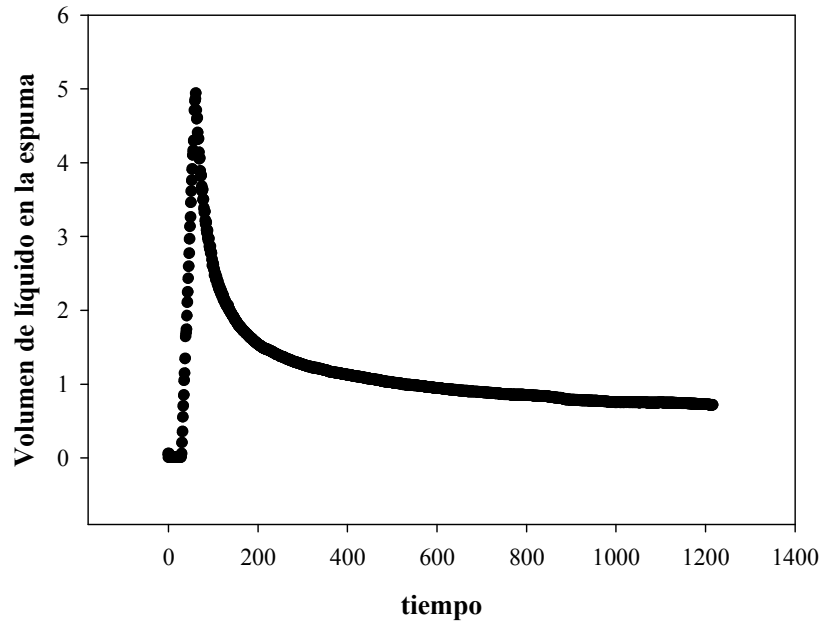


Figura 2.11: Forma típica de las curvas de volumen de líquido en la espuma (V_{LE}), calculada con la ecuación 2.8, en el tiempo. Las unidades de volumen y tiempo son arbitrarias. V_{LE} antes de iniciarse el espumado tiene un valor igual a cero. Al comenzar el espumado V_{LE} aumenta en forma lineal hasta un máximo en cuyo tiempo se detiene el espumado y luego del cual V_{LE} disminuye debido al drenado de líquido desde la espuma hacia la solución

DE se define como el cociente entre el líquido máximo incorporado en la espuma (V_{LEmax}) y el volumen de espuma llegado al final del período de burbujeo (V_{Emax}):

$$DE = V_{LEmax} / V_{Emax} \quad (2.21)$$

Se ha observado que

$$V_{Emax} = V_E - (V_{ini} - V_{LEmax}) \quad (2.22)$$

$T_{1/2}$, el tiempo de vida media de drenaje, es igual a:

$$T_{1/2} = t_{1/2} - t_0 \quad (2.23)$$

Donde $t_{1/2}$ es el tiempo en que la mitad del volumen máximo de líquido en la espuma volvió a la solución ($V_{LEmax}/2$) y t_0 es el tiempo al final del burbujeo. $T_{1/2}$ está relacionado a la habilidad de la proteína a absorberse rápidamente en la interfase aire/solución y disminuir el drenado justo después de la formación de la espuma.

Por otra parte, en cuanto a la variación del volumen con el tiempo, una espuma es más estable cuando tarda mayor tiempo en colapsar (derrumbarse) [46]. Esto se puede medir a través del tiempo cuarto de volumen de espuma ($T_{1/4}$), que se define como:

$$T_{1/4} = t_{1/4} - t_0 \quad (2.24)$$

Donde $t_{1/4}$ es el tiempo necesario para que $V_{E_{max}}$ decaiga en un 25 % y t_0 es el tiempo al final del burbujeo.

Las mediciones de conductividad de la espuma (Figura 2.12) en el tiempo (C_{Et}) se utilizaron para calcular el tiempo necesario para que la espuma tenga un valor de conductividad menor a 10 mS m^{-1} (T_{C10}), que se define como:

$$T_{C10} = t_{C10} - t_0 \quad (2.25)$$

Donde t_{C10} es el tiempo necesario para que la conductividad de la espuma tenga un valor menor a 10 mS m^{-1} y t_0 es el tiempo al final del burbujeo.

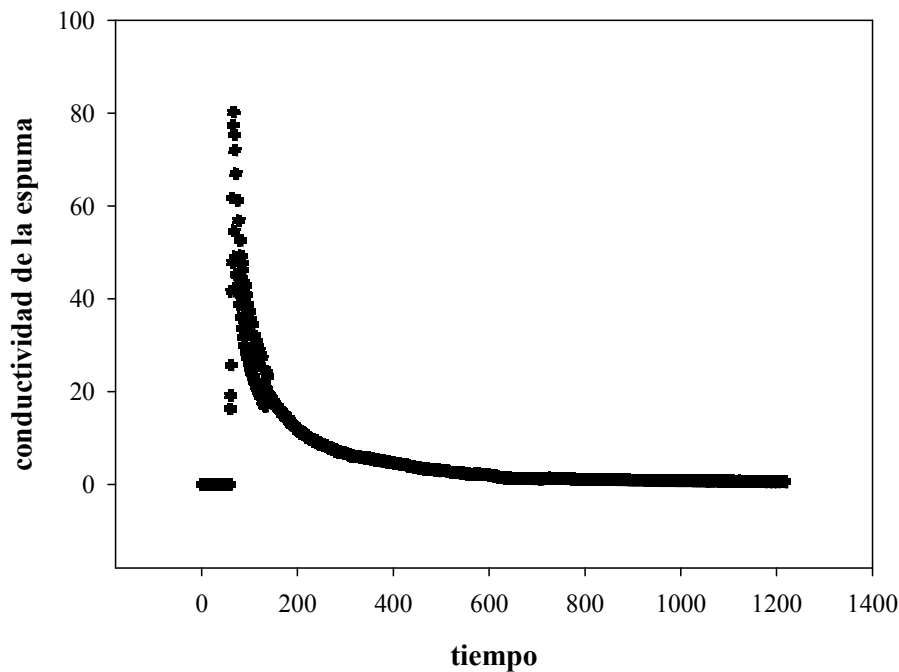


Figura 2.12: Forma típica de las curvas de conductividad de la espuma en el tiempo. Las unidades de conductividad y tiempo son arbitrarias. La conductividad de la espuma antes de iniciarse el espumado tiene un valor igual a cero. Al comenzar el espumado la conductividad de la espuma aumenta en forma lineal hasta un máximo en cuyo tiempo se detiene el espumado y luego del cual disminuye debido al drenado de líquido desde la espuma hacia la solución

Las espumas son comparadas mediante:

- (i) Densidad de la espuma (DE) como medida de actividad espumante.
- (ii) Tiempo de vida media de drenaje ($T_{1/2}$),
- (iii) tiempo cuarto de volumen de espuma ($T_{1/4}$) y

(vi) tiempo necesario para que la conductividad de la espuma sea $< 10 \text{ mS m}^{-1}$ (T_{C10}), como medidas de estabilidad de la espuma [28, 47].

2.5.13. Diseño de experimentos

Los ensayos con diseño de experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a un diseño Factorial (3^2) en el cual se estudió los efectos de dos factores en tres niveles. El diseño fue corrido en un solo bloque y el orden de los experimentos fue completamente aleatorizado [24, 48]. Luego se investigó la actividad y estabilidad espumante por el método ya descrito. Los parámetros seleccionados como respuestas fueron las siguientes: DE para la actividad espumante y T_{C10} , $T_{1/2}$ y $T_{1/4}$ para la estabilidad espumante.

2.5.14. Análisis estadístico

El programa STATGRAPHICS Centurion (StatPoint, Inc) fue usado para analizar el diseño de experimento y obtener la tabla ANOVA, el diagrama de Pareto y el Coeficiente de regresión. El programa Wolfram Mathematica (Wolfram Research, Inc.) fue usado para graficar la Superficie de Respuesta.

3. Resultados y discusión

3.1. Tratamiento térmico

3.1.1. Conocimientos previos

Una de las maneras más simples de alterar la funcionalidad de las proteínas es por tratamientos térmicos suaves que modifiquen la estructura de la proteína causando agregación pero que a la vez no den lugar a precipitación [3]. El uso del calentamiento de soluciones de la β -LG para mejorar la estabilidad espumante es intensamente estudiado bajo diversas condiciones del sistema [21, 28]. Con respecto a las propiedades emulsionantes recientemente se demostró que el calentamiento de soluciones de β -LG 5,5 % P/V disminuye tanto la actividad como la estabilidad [49].

Tosi y col. [48] estudiaron las propiedades espumantes de soluciones de concentrado del suero lácteo tratadas térmicamente entre 75 y 85 °C de temperatura durante 5 a 20 min. Estos autores hallaron que en casi todo el rango de temperatura y tiempo estudiado hay mejora tanto en la actividad como en la estabilidad espumante. Trabajando con soluciones de aislado de proteína de suero lácteo, 10 % P/V de concentración, tratadas térmicamente Bals y col. [50] demostraron que la desnaturalización de la β -LG mejora notablemente la estabilidad de la espuma. Estos autores también demostraron que con un grado de desnaturalización mayor al 70 % es posible reducir en gran medida el drenaje de líquido.

Con respecto a las modificaciones estructurales sobre la β -LG por calentamiento y su alteración de las estructuras alergénicas la capacidad de unión a la inmunoglobulina E se reduce por calentamiento entre 80 a 100 °C durante 15 min. Igualmente permanece una alergenicidad residual incluso después de un calentamiento severo [51]. Según Delorenzi y col. [6] la disminución de la alergenicidad se debe al incremento de la digestibilidad y es consecuencia de la desnaturalización térmica la cual favorece la ruptura de las estructuras de epítomos.

En base a estos conocimientos se propone modificar la β -LG 25 mg mL⁻¹ por calentamiento a 85 °C durante 1 a 15 min y estudiar su efecto sobre las propiedades funcionales superficiales.

3.1.2. Electroforesis

Las muestras tratadas fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE en condiciones no reductoras y las diferentes especies se cuantificaron por densitometría gel. El medio no reductor usado en la electroforesis permite la dispersión de agregados unidos a través de interacciones hidrofóbicas, mientras que los agregados unidos por puentes disulfuro permanecen intactos.

El análisis de imagen del gel electroforético para β -LG 25 mg mL⁻¹, pH 6,8, calentada a 85 °C desde 1 a 15 min se muestra en la Figura 3.1.

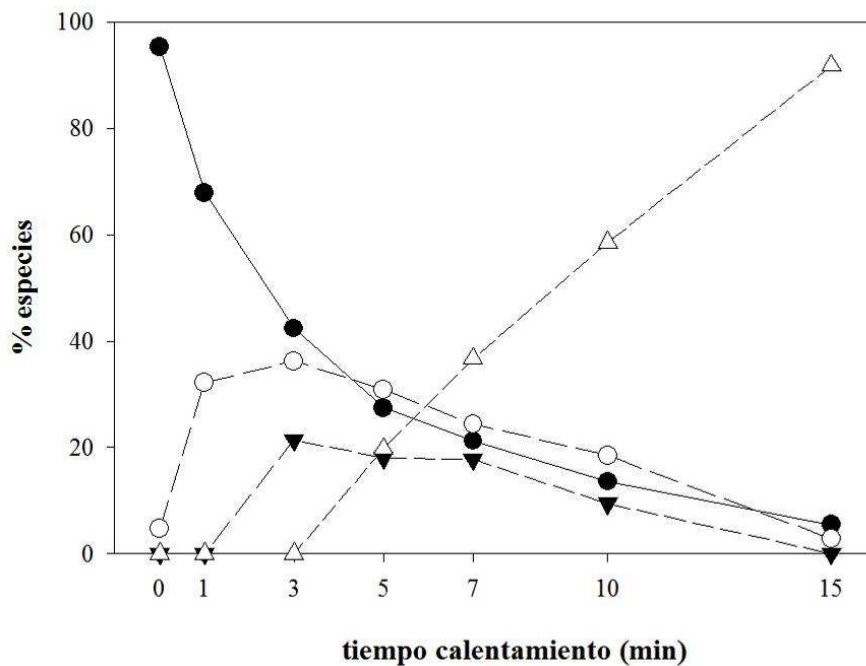


Figura 3.1: Análisis de imagen generado por software para β -LG tratada térmicamente. Proporción de especies en porcentaje: (●) monómero, (○) dímero, (▼) trímero y (Δ) oligómero versus tiempo de calentamiento de 0 a 15 min.

A tiempo 0 de calentamiento puede observarse la β -LG nativa. Con el incremento del tiempo de calentamiento de la solución de β -LG disminuye la cantidad de monómeros y se observa un aumento de dímeros y trímeros, obteniéndose un máximo que se alcanza a los 3 min. A este tiempo la proporción de especies es: 46 % de monómeros, 36 % de dímeros y 21 % de trímeros. Con respecto a los oligómeros se observa que comienzan a formarse cuando las concentraciones de dímeros y trímeros sobrepasan los 3 min de calentamiento. Después de los 10 min de calentamiento las especies oligoméricas representan aproximadamente el 60 % del total de especies.

3.1.3. Dicroísmo circular

Los efectos del calentamiento de soluciones de β -LG 25 mg mL^{-1} en los espectros de DC UV cercano se muestran en la Figura 3.2. Los análisis de los espectros fueron utilizados para caracterizar la estructura terciaria de las proteínas, principalmente a causa de las asimetrías en el medio ambiente de los aminoácidos aromáticos [52]. Los dos picos negativos de elipticidad en 285 y 292 nm en el espectro de DC de β -LG nativa se deben principalmente a la absorbancia del Trp19 [53]. Estos dos picos negativos disminuyeron su intensidad con el tratamiento térmico en mayor proporción hasta los 3 min de calentamiento, reflejando los cambios estructurales en el cáliz de la molécula de β -LG donde se encuentra el Trp19 [54].

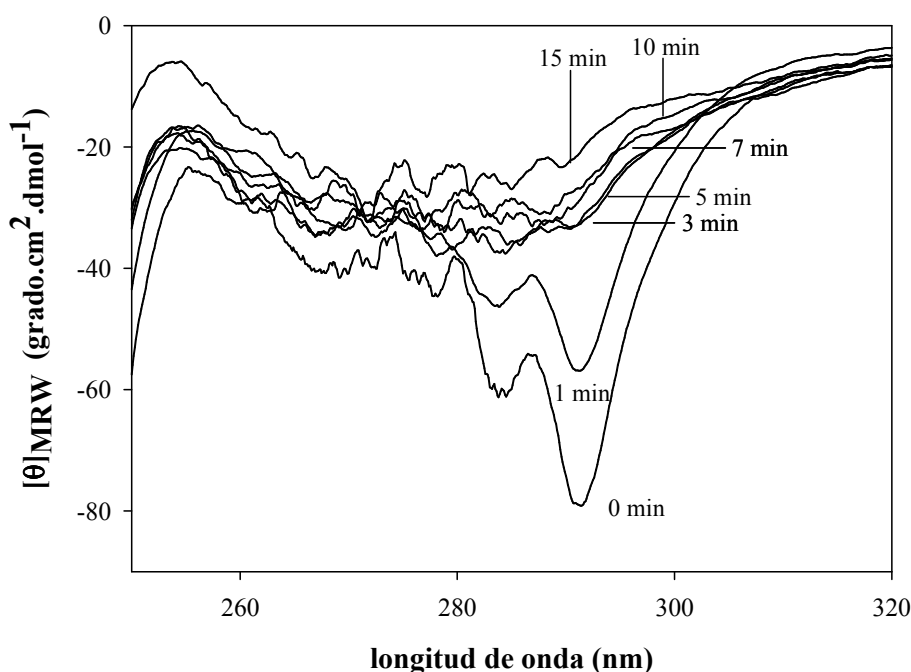


Figura 3.2: Espectros de DC en el UV cercano de la β -LG 25 mg mL^{-1} , pH 6,8, calentada a $85 \text{ }^\circ\text{C}$ desde 0 a 15 min.

Los efectos del calentamiento de soluciones de β -LG 25 mg mL^{-1} en los espectros de DC UV lejano se muestran en la Figura 3.3. El pico negativo, longitud de onda a la cual se presenta un mínimo de elipticidad molar (λ_{min}), se desplaza rápidamente con el tiempo de calentamiento desde la región de los 215 nm para la β -LG nativa hasta 210 nm para la β -LG calentada 3 min y luego gradualmente hacia 208 nm para β -LG calentada 15 min (Tabla 3.1). Los desplazamientos de λ_{min} son pronunciados

hasta los 3 min de calentamiento, disminuyendo las variaciones a tiempos de calentamiento superiores.

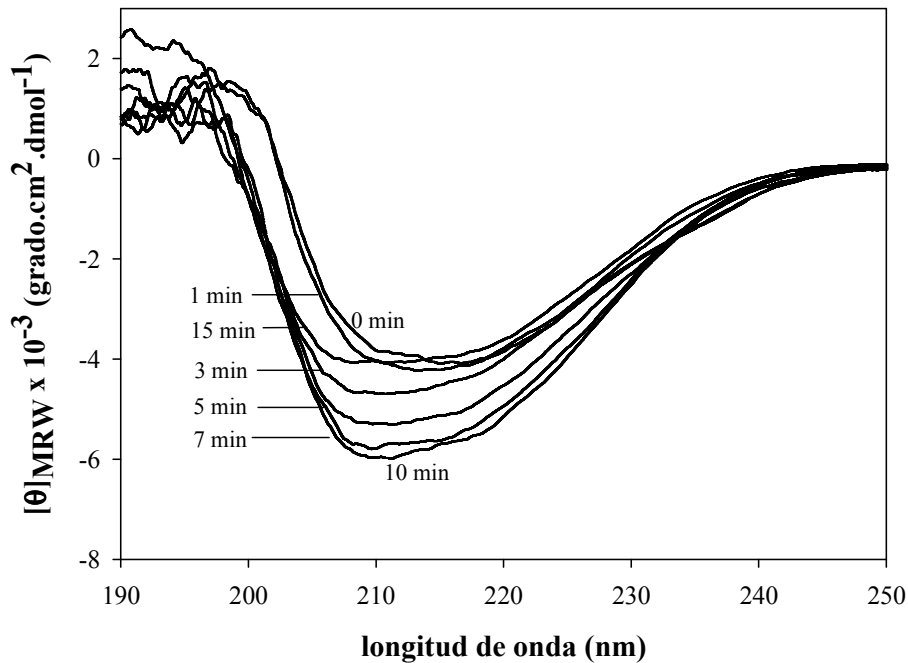


Figura 3.3: Espectros de DC en el UV lejano de la β -LG 25 mg mL^{-1} , pH 6,8, calentada a $85 \text{ }^\circ\text{C}$ desde 1 a 15 min

Tabla 3.1: Desplazamiento del pico de la región de los 210-220 nm hacia la de 200-210 nm de la β -LG 25 mg mL^{-1} , pH 6,8, calentada a $85 \text{ }^\circ\text{C}$ desde 1 a 15 min

Tiempo de calentamiento (min)	$\lambda_{\text{mín}}$ (nm)
0	$215,0 \pm 0,2$
1	$214,2 \pm 0,2$
3	$210,1 \pm 0,4$
5	$209,5 \pm 0,2$
7	$209,5 \pm 0,3$
10	$209,5 \pm 0,4$
15	$208,2 \pm 0,4$

Al estudiar el efecto del calentamiento de soluciones de β -LG en los espectros de DC UV lejano Kim y col. [21] y Moro y col. [28] hallaron corrimientos similares que fueron relacionados con la disminución de hélice α y un aumento en el contenido de ovillo estadístico. Kim y col. hallaron que el desplazamiento de $\lambda_{\text{mín}}$ fue más pronunciado a los 5 min de calentamiento mientras que para Moro y col. fue a los 3

min. Estas diferencias pueden deberse a las distintas condiciones del tratamiento: i) 80 °C de temperatura y 1 mg mL⁻¹ de concentración para Kim y col. y ii) 85 °C de temperatura y 55 mg mL⁻¹ de concentración para Moro y col.

3.1.4. Extinción de la fluorescencia

El despliegue de la proteína provoca un desplazamiento hacia el rojo en la longitud de onda de emisión de fluorescencia (λ_{\max}) debido a la exposición de residuos Trp al disolvente acuoso. Este hecho también promueve un aumento en la extinción de fluorescencia por acrilamida de la β -LG desnaturalizada [55-57]. Cuanto más flexible es la estructura de la proteína y mayor es la proporción de especies desplegadas más pronunciada es la pendiente del gráfico de Stern-Volmer y mayor la K_{SV} . Además, durante el proceso de desplegado, la superficie de la proteína se vuelve más hidrofóbica debido a la aparición de aminoácidos no polares, los cuales estaban previamente dentro del cáliz de la proteína. De esta manera, los valores de K_{SV} también se utilizan como una medida de la hidrofobicidad superficial [56].

En el rango de extintor usado los gráficos de Stern-Volmer para la extinción de la fluorescencia intrínseca de la β -LG por agregado de acrilamida son aproximadamente lineales (Figura 3.4).

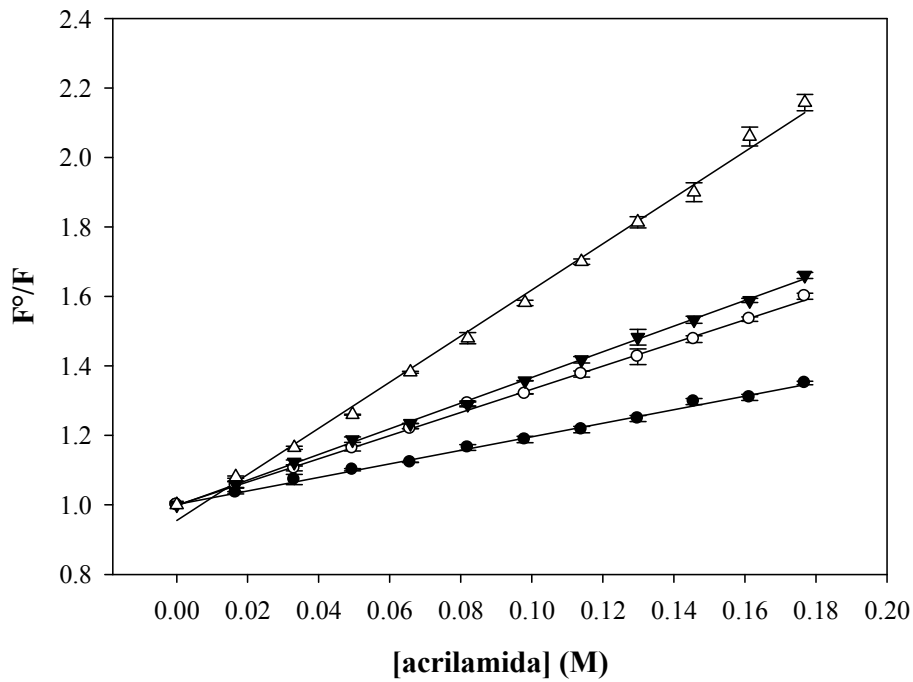


Figura 3.4: Gráficos de Stern-Volmer correspondientes a la extinción de la fluorescencia intrínseca de la β -LG por adición de acrilamida. β -LG sometida a calentamiento a 85 °C durante distintos tiempos: 0 minutos (●), 3 minutos (○), 15 minutos (▼). β -LG en urea 8 M (▲).

La pendiente, obtenida del ajuste por regresión lineal, corresponde al valor de K_{SV} y puede ser usada como medida de la HS, observándose que el calentamiento provoca un aumento de la misma. Por lo tanto el calentamiento de la β -LG provoca un aumento de la HS.

Los valores de pendiente obtenidos de los ajustes lineales en los gráficos de stern-Volmer (K_{SV}) se graficaron en función del tiempo de calentamiento (Figura 3.5). Estos muestran concordancia con las medidas de DC al evidenciar la rapidez con que se dan los cambios conformacionales por tratamiento térmico, ya que solamente 3 min de calentamiento son suficientes para producir los cambios más pronunciados en la estructura de la proteína.

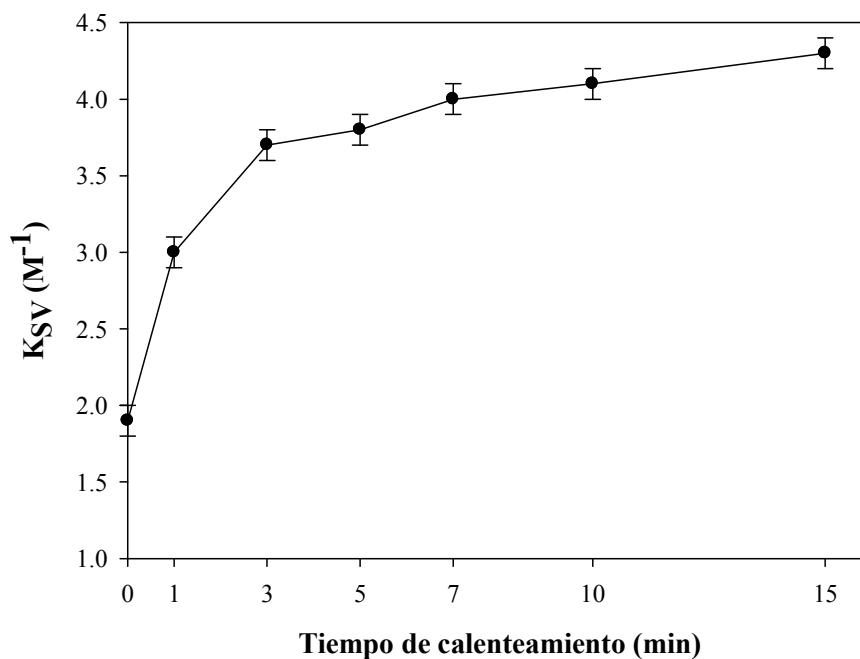


Figura 3.5: Valores de K_{SV} obtenidos a partir de las pendientes de los gráficos de Stern-Volmer para β -LG sometida a calentamiento previo a 85 °C durante distintos tiempos.

3.1.5. Desnaturalización química por medidas de fluorescencia

En este estudio se determina el efecto de la concentración de urea sobre el estado conformacional de la β -LG. Las curvas, como las obtenidas en la Figura 3.6, muestran como varía F_{des} (fracción de proteína con cambio conformacional) calculada con la ecuación 2.4 utilizando λ_{max} como propiedad observable en función de la concentración de urea. Estas gráficas permiten visualizar de manera rápida y sencilla que tratamientos provocan mayor cambio conformacional. Aquellas curvas que estén más desplazadas hacia la izquierda corresponden a los tratamientos que provocan mayores cambios conformacionales y se debe a que necesitan menor concentración de urea para obtener un mismo valor de F_{des} .

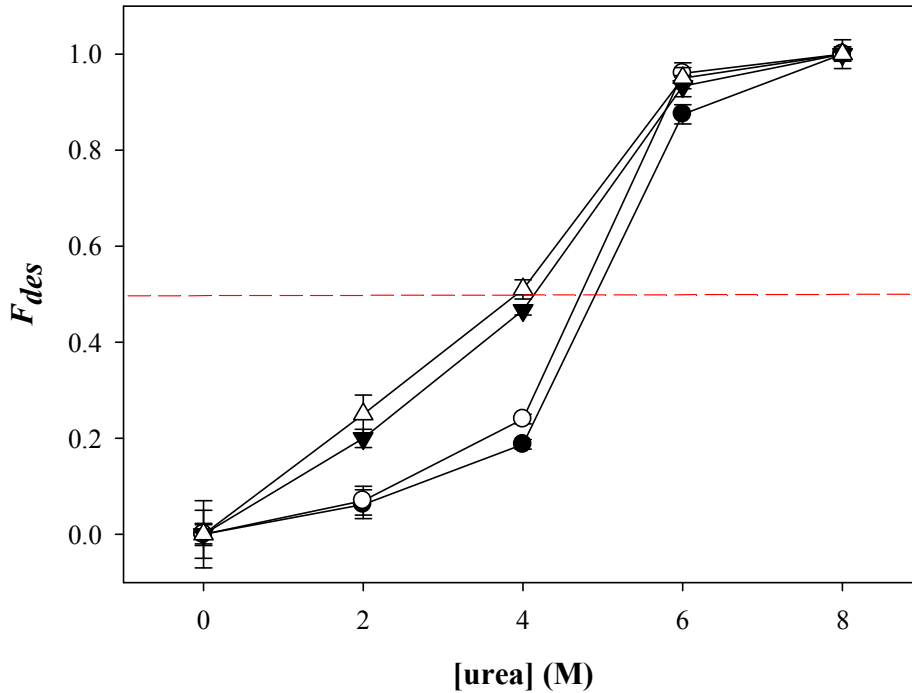


Figura 3.6: Perfiles de desnaturalización de β -LG por acción de urea obtenidos por medidas de λ_{\max} . β -LG sometida a calentamiento previo a 85 °C durante distintos tiempos: 0 minutos (●), 1 minutos (○), 3 minutos (▼) y 15 minutos (▲). $F_{des} = 0,5$ (-----).

En la Figura 3.6 sólo se muestran las curvas correspondientes a β -LG calentada a 85 °C durante 0, 1, 3 y 15 min. Se observó una mayor fracción de β -LG desnaturalizada a bajas concentraciones de urea para el tratamiento térmico que para la nativa.

En la Tabla 3.2 se presentan los valores de $[\text{urea}]_{1/2}$ para todos los tiempos de calentamiento estudiados. $[\text{urea}]_{1/2}$ es la concentración molar de urea necesaria para lograr un F_{des} de 0,5 y cuanto más estructura conserve la proteína más alto será el valor de $[\text{urea}]_{1/2}$.

Tabla 3.2: Estudios de fluorescencia de β -LG tratada en presencia de urea. $[\text{urea}]_{1/2}$ está determinado por el perfil de desnaturalización química de especies de β -LG en presencia de urea (0-8 M), suponiendo un modelo de dos estados.

Tiempo de calentamiento (min)	$[\text{urea}]_{1/2}$ (M)
0	$4,8 \pm 0,1$
1	$4,6 \pm 0,2$
3	$4,2 \pm 0,1$
5	$4,1 \pm 0,1$
7	$4,0 \pm 0,1$
10	$3,9 \pm 0,2$
15	$3,8 \pm 0,1$

Para los tiempos ensayados se obtuvo una rápida disminución de la concentración de urea para llegar a un F_{des} de 0,5 ($[\text{urea}]_{1/2}$) hasta los 3 min de calentamiento para luego disminuir más lentamente, indicando que el proceso de desplegado por parte del calentamiento es rápido. Estos resultados son coherentes con los obtenidos por medidas de DC y extinción de la fluorescencia.

3.1.6. Desnaturalización térmica por diferencia de absorbancia a 293 nm.

La Figura 3.7 muestra los cambios en la diferencia de absorbancia UV a 293 nm para las diferentes muestras de proteínas en función de la temperatura. El despliegue del monómero de β -LG nativo produce perfiles de desnaturalización en forma de S a temperaturas entre 60 y 90 °C, con una temperatura aparente para la desnaturalización del 50 % de la proteína cercano a los 75 °C [33]. Las medidas de $\Delta\text{Abs}_{293\text{nm}}$ se incrementan abruptamente cuando la solución se calienta por encima de 90 °C lo que evidencia la formación de agregados de diferentes especies de la proteína [55]. La β -LG no se despliega a ovillo estadístico antes de la agregación en la etapa final de la desnaturalización térmica [58]. Además, los valores de $\Delta\text{Abs}_{293\text{nm}}$ obtenidos para la muestra calentada 1 min (aproximadamente 0,04) y para la muestra calentada 3 min (aproximadamente 0,005) indican una rápida pérdida de estructura al ser sometida al tratamiento térmico ($\Delta\text{Abs}_{293\text{nm}}$ para β -LG nativa aproximadamente 0,08). Para los tratamientos térmicos de 5 a 15 min los valores de $\Delta\text{Abs}_{293\text{nm}}$ obtenidos son similares a la muestra calentada 3 min.

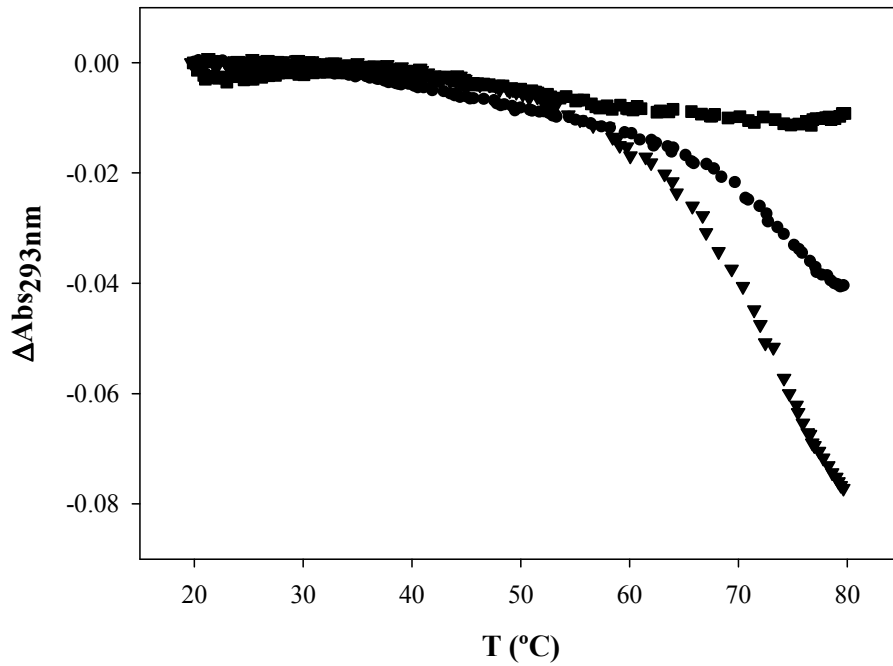


Figura 3.7: Gráficos de desnaturalización térmica de la β-LG seguida por diferencia de absorbancia a 293 nm. β-LG sometida a calentamiento a 85 °C durante: 0 min (▼), 1 min (●) y 3 min (■).

3.1.7. Cambios conformacionales

Las medidas de DC evidencian que los cambios conformacionales por el tratamiento térmico son rápidos, ya que solamente son necesarios 3 min para producir las modificaciones más pronunciadas en la estructura secundaria y terciaria. Estudios de extinción de la fluorescencia intrínseca, desnaturalización química y térmica conducen a resultados similares. Los ensayos electroforéticos indican que a los 3 min de calentamiento se producen la mayor proporción de dímeros y trímeros. Este hecho será relevante al momento de discutir las propiedades funcionales. Moro y col. [28] encontraron similares comportamientos al trabajar con β-LG de concentración 55 mg mL⁻¹.

3.1.8. Espumas

La actividad espumante hace referencia a la habilidad de la proteína de atrapar mayor cantidad de aire en las burbujas, o sea formar más espuma en menor tiempo. La estabilidad refiere a la capacidad de la proteína de hacer perdurar la espuma durante más tiempo [3, 27-28]. Los procesos de desestabilización de la espuma son: drenaje de líquido, acercamiento de las superficies adyacentes de la burbuja que lleva a la ruptura

de la película (coalescencia) y difusión del gas en la fase continua (maduración de Ostwald o desproporción) que resulta en engrosamiento de la burbuja. Todos estos mecanismos se producen al mismo tiempo después de que se detiene el burbujeo de aire. Mientras que al principio prevalecen el drenaje y la coalescencia, cuando las burbujas son principalmente esféricas, la desproporción es más importante en etapas avanzadas, cuando las burbujas son poliédricas. Finalmente la espuma se derrumba. [28]

Los efectos del tratamiento térmico sobre las propiedades espumantes de soluciones de β -LG en las condiciones ensayadas se muestran en la Figura 3.8. Tanto la actividad como la estabilidad espumante fueron modificadas por el calentamiento.

La actividad espumante, medida por la densidad de la espuma (DE), fue mejorada con un incremento máximo cercano al 45 % hasta 10 min de calentamiento. La adsorción de una proteína en cantidad suficiente es una condición necesaria para la eficiente formación de la espuma y está relacionado con la velocidad a la que se disminuye la tensión superficial. Por lo tanto, uno de los factores más importantes para la formación de espuma es la velocidad de adsorción de proteínas, que depende de la concentración, el peso molecular, la estructura de la proteína y las condiciones de la solución (pH, etc.). Cuanto más pequeñas, desordenadas y flexibles sean las proteínas son mejores tensoactivos que las proteínas grandes, ordenadas y rígidas.

La actividad espumante mejora con el incremento de la hidrofobicidad superficial de la proteína [44, 56, 59-60]. Cuanto mayor sea el grado de desnaturalización que sufre una proteína mayor hidrofobicidad superficial van a presentar, lo cual conduce a una mayor afinidad de la proteína por la interfase. Este hecho promueve una rápida disminución de la tensión superficial y un aumento de la actividad espumante de la proteína.

Como se ha mencionado, después de 3 min de tratamiento térmico se produjeron monómeros de β -LG no nativos y otras especies desnaturalizadas de mayor peso molecular (Figura 3.1). El tratamiento térmico produce simultáneamente dos consecuencias: (i) producción de agregados de β -LG de pesos moleculares más altos y (ii) desnaturalización térmica con la exposición de residuos hidrofóbicos. Aunque la presencia de agregados produce una reducción en el coeficiente de difusión, un factor desfavorable para la formación de espuma, la exposición de los residuos hidrofóbicos es un factor favorable para la actividad espumante. En vista de los resultados observados, el incremento en la hidrofobicidad superficial se convirtió en el factor más importante en la formación de la espuma.

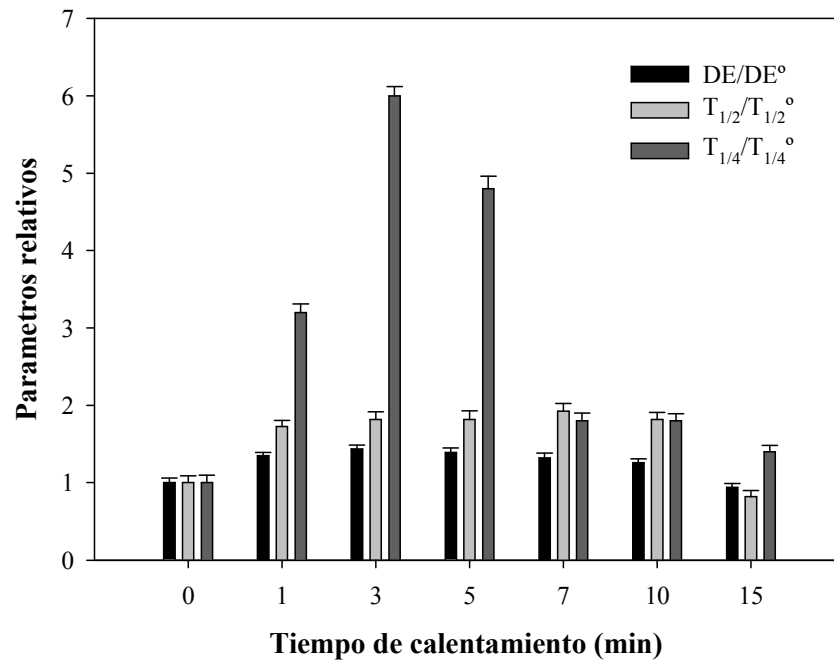


Figura 3.8: Propiedades espumantes de β -LG tratada térmicamente. Los parámetros son informados como proporciones relativas a los de β -LG nativa.

La estabilidad espumante, estimada por el tiempo de colapso de la espuma ($T_{1/4}$) y el tiempo de vida media de drenado ($T_{1/2}$), se incrementó en diferentes proporciones en comparación con la muestra no calentada hasta los 10 min de tratamiento (Figura 3.8). A los 15 min la estabilidad decrece y para tiempos superiores la espuma colapsa rápidamente.

El $T_{1/2}$ verifica un incremento del 70 % al 90 % en el intervalo de 1 a 10 min de calentamiento. El aumento observado de $T_{1/2}$ con el calentamiento está directamente asociado con un aumento de la viscosidad de la solución de proteína, debido a la presencia de agregados desnaturalizados de β -LG más asimétricos, lo que disminuye la velocidad de drenaje [60].

Por otro lado, $T_{1/4}$, tiempo requerido para una caída del 25 % del volumen de la espuma, aumentó aún más que $T_{1/2}$ en el mismo intervalo de tiempo. De esta manera, se encontró un pico a los 3 min donde el incremento fue aproximadamente del 600 %, lo cual es consistente con los cambios conformacionales más significativos de la β -LG. Kim y col. [21] llegaron a resultados similares, pero sólo después de calentar la β -LG para un tiempo más largo (30 min). En ese tiempo de calentamiento estos autores encontraron similar proporción de monómero, dímero y trímero como el reportado

durante 3 min de calentamiento en esta Tesis. Este hecho demuestra que, independientemente del tiempo de calentamiento, la estabilidad de la espuma está estrechamente relacionada con los cambios estructurales de la proteína.

A los 15 min de tratamiento se observó una fuerte caída en las propiedades espumantes. La solución de β -LG calentada 3 min a 85 °C posee la mayor actividad y estabilidad espumante. Esto puede deberse a que en los primeros tiempos de tratamiento las especies de β -LG están parcialmente desnaturalizados, lo cual aumenta su HS y les confiere una mayor afinidad por la interfase. A tiempos altos de calentamiento la formación de agregados de alto peso molecular produce reducción en la capacidad de difundir y desenrollarse en la interfase desfavoreciendo las propiedades espumantes de la β -LG.

3.1.9. Emulsiones

En la Figura 3.9 se grafican los valores de $D[4,3]/D[4,3]^\circ$ para las muestras calentadas a 0, 3, 7 y 15 min como representativas de todos los tiempos de calentamiento estudiados. $D[4,3]^\circ$ corresponde al valor de $D[4,3]$ para la proteína sin tratar. $D[4,3]$, obtenido a partir de las distribuciones de tamaños de gotas en volumen, aumentó con el tiempo de tratamiento térmico de 19 ± 1 nm a 26 ± 1 nm, para las muestras sin calentar y calentada 15 min. Si bien $D[4,3]$ es un parámetro de la actividad emulsionante, tanto la actividad como la estabilidad están estrechamente vinculadas a los tamaños de gotas: un pobre emulsionante conduce a gotas grandes y, por lo tanto, a una emulsión más inestable. Debido a esto la tendencia observada de $D[4,3]$ puede considerarse como una estimación de la estabilidad de la emulsión.

Otro parámetro muy utilizado para estudiar la actividad y estabilidad emulsionante es el índice de actividad emulsionante (IAE) el cual está relacionado con la superficie creada durante el emulsionado. La Figura 3.9 muestra el modo en el cual el índice de actividad emulsionante relativo (IAE/IAE°) decae con el tiempo de calentamiento de β -LG. IAE° corresponde al valor de IAE para la proteína sin tratar. IAE está directamente relacionado con el área interfacial generada durante el proceso de emulsificación. Así un valor más bajo de IAE implica tamaños de gotas más grandes lo cual será un factor decisivo en la desestabilización de la emulsión.

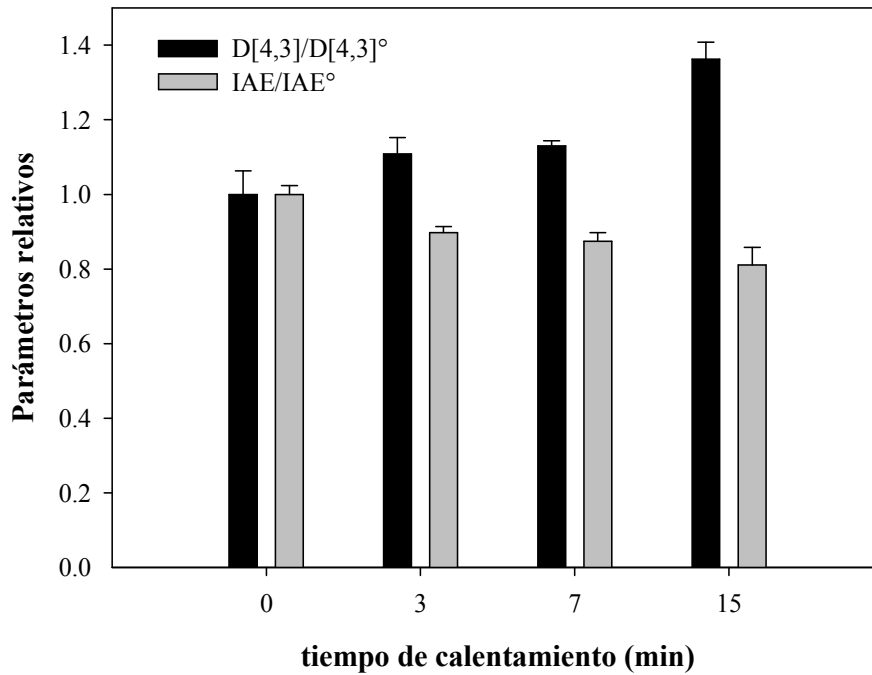


Figura 3.9: D[4,3]/D[4,3][°] en volumen e IAE/IAE[°] versus tiempo de calentamiento de β -LG 0, 3, 7 y 15 min . Los parámetros son informados como proporciones relativas a los de β -LG nativa. D[4,3][°] β -LG nativa: 19 ± 1 nm. IAE[°] β -LG nativa: $12,7 \pm 0,3$ m² g⁻¹.

Kato y col. [61] encontraron una correlación directa entre hidrofobicidad superficial y actividad emulsionante en una amplia gama de proteínas tanto en el estado nativo como desnaturalizado. Como ya se demostró la hidrofobicidad superficial de β -LG creció con el tiempo de calentamiento (Figura 3.5) y, por lo tanto, sería de esperar un incremento de la actividad emulsionante con el tratamiento térmico. Por el contrario la actividad emulsionante disminuyó (Figura 3.9). Como consecuencia, en este caso, la hidrofobicidad superficial parece ser un factor menos importante y otros factores podrían haber adquirido mayor relevancia. Uno de estos factores puede ser el gran tamaño de los agregados formados, los cuales son mayoría luego de 10 min de calentamiento cuando representan más del 60 % de las especies presentes (Figura 3.1). Aunque la homogeneización genera turbulencias que permiten que estos agregados lleguen a la interfase a través de transporte de masas por convección, su baja flexibilidad y/o su gran tamaño pueden ser los factores responsables de evitar la adherencia adecuada a la interfase de las gotas, obteniéndose valores progresivamente menores de IAE.

Se ha observado también que otro factor importante es el tiempo en el que se forma la película interfacial. La película es más eficiente en la protección contra las

colisiones de las gotas siempre y cuando se forma rápidamente. Esto implica que la proteína debe contener suficiente cantidad de grupos hidrófobos y tienen que ser relativamente accesible en una escala de tiempo corto para permitir la penetración y la difusión de las moléculas adsorbidas en la interfase. Los agregados de mayor peso molecular podrían no ser capaces de desarrollar todo este proceso lo suficientemente rápido como lo pueden hacer las otras especies más pequeñas (monómeros no nativos, dímeros, trímeros y oligómeros de bajo peso molecular).

La separación de fases se muestra en la Figura 3.10. Las imágenes corresponden a emulsiones formadas con β -LG tratada térmicamente en condición de reposo durante 15 días. Estas imágenes son un control visual de la separación de fases que han sufrido las emulsiones. En los tubos correspondientes a las emulsiones formadas con tratamiento térmico hasta 3 min la fase aceite esta separada. En cuanto al sistema formado con tratamiento térmico de 5 y 7 min la fase aceite es menor y para mayores tiempos de calentamiento las emulsiones no mostraron fase aceite separada. Teniendo en cuenta que la cantidad de agregados más grandes aumentaron con el tiempo de calentamiento y que pudieron ser arrastrados a la parte superior durante el proceso de formación de crema, se puede suponer que estos agregados juegan un papel estérico protector contra la separación de fases, colocándose entre las gotas de aceite y así evitando el contacto y la posterior coalescencia.



Figura 3.10: Fotografía de 15 días de estacionamiento de las emulsiones formadas con β -LG tratada térmicamente durante diferentes tiempos. De izquierda a derecha: 0, 1, 3, 5, 7, 10 y 15 min.

La coalescencia, como proceso de desestabilización, es el primer paso para la separación de fases. Dependiendo de la región de la emulsión se observa que: i) la "coalescencia en el seno de la solución" se ve favorecida por el movimiento browniano y ii) la "coalescencia en la fase crema" es causada por la cercanía permanente entre sí de las gotas. Por lo tanto, la disposición de los agregados más grandes debe ser un factor importante para la coalescencia de gotas de aceite y la separación de fases. Los agregados, una vez arrastrados a la parte superior por las gotas de aceite, se pueden organizar entre ellos como bloques en arreglos de múltiples capas o incluso pueden

estar vinculados entre sí a través de interacciones hidrofóbicas por sectores de la proteína que fueron expuestos por la desnaturalización térmica. En cualquier caso, la presencia de los agregados puede hacer más difícil los contactos de las gotas evitando la coalescencia y mejoran aún más su papel protector contra la separación de fases.

3.1.10. Comparación entre las propiedades espumantes y emulsionantes de la β -LG tratada térmicamente

Comparando las propiedades espumantes y emulsionantes se observaron efectos opuestos en función del tiempo de calentamiento. Mientras que hasta 10 min de tratamiento térmico a 85 °C mejoró tanto la capacidad como la estabilidad espumante las propiedades emulsionantes disminuyeron. Tanto la formación de espuma y las propiedades emulsionantes disminuyen para mayores tiempos de calentamiento. Estos hechos pueden ser debido a las diferentes escalas de tiempo que requieren la formación de espumas y emulsiones: mientras que las espumas necesitan tiempos más largos para ser formadas las emulsiones implican procesos más rápidos. En las espumas, la mayor escala de tiempo permite una mejor disposición del agente espumante en la interfase de la burbuja y más interacciones hidrófobas que mejoran la estabilidad de la espuma a través de la rápida formación de una película viscoelástica más rígida, lo que finalmente conduce a una mejora de las propiedades espumantes. Por otro lado, cuando se forma una emulsión, los procesos más rápidos obstaculizan una adecuada adsorción de los agregados del agente emulsionante a la interfase de las gotas, lo que conduce a peores propiedades emulsionantes con el tiempo de calentamiento.

En el caso de las emulsiones la presencia de agregados de bajo peso molecular es suficiente para causar la disminución de las propiedades emulsionantes. Durante la homogenización la mayor parte del proceso se produce en escalas de tiempo de milisegundos o menos: i) adsorción y difusión del emulsionante y ii) deformación y colisión de gotas. La distribución final de tamaño de gota es el resultado de la combinación del tiempo necesario para que la interfase sea cubierta con emulsionante y el tiempo medio entre colisiones de gotas. Con el fin de hacer más eficiente el proceso de emulsificación la distribución del emulsionante en la interfase debería ser un proceso más rápido que la colisión entre las gotas. Cuando el emulsionante se adsorbe lentamente y/o está presente en una concentración demasiado baja, la mayoría de las gotas individuales, formadas durante la emulsificación, no se conservan en la emulsión final. Para retener las pequeñas gotas durante la emulsificación, el tiempo entre

colisiones de gotas debe ser más largo que el necesario para que el emulsionante se adsorba en la nueva interfase aceite-agua y para crear una capa estabilizadora.

La hidrofobicidad superficial tiene un impacto diferente en la capacidad espumante y emulsionante. Aunque en el estudio sobre las espumas la hidrofobicidad superficial de la β -LG fue reconocida como el principal factor influyente para mejorar la capacidad espumante, en el estudio de las emulsiones, la actividad emulsionante no se vio afectada en la misma medida y la hidrofobicidad superficial no era lo suficientemente importante como para compensar la presencia de agregados de mayor peso molecular, que pueden ser los responsables por la menor actividad emulsionante.

3.2. Polimerización enzimática con transglutaminasa. Comparación con el tratamiento térmico.

3.2.1. Conocimientos previos

En el apartado anterior se demostró que el tiempo de calentamiento de soluciones de β -LG es una variable crucial para las propiedades funcionales superficiales. Esto se debe a los cambios conformacionales y las diferentes proporciones de especies en solución formadas durante el calentamiento. En el estudio del calentamiento de soluciones de β -LG 25 mg mL^{-1} a $85 \text{ }^\circ\text{C}$ se demostró que a los 3 min de tratamiento ocurren los cambios conformacionales y procesos de agregación más significativos, formándose monómeros no nativos y la mayor cantidad de dímeros y trímeros. El tratamiento térmico afecta tanto la actividad como la estabilidad espumante. Ambas propiedades espumantes están relacionadas con los cambios estructurales de la proteína. Se considera que el incremento en la hidrofobicidad superficial es el factor decisivo en la mejora de la capacidad espumante a pesar de la presencia de agregados de mayor peso molecular.

La enzima transglutaminasa cataliza la reacción de transferencia acílica entre el grupo γ -carboxiamida de residuos de glutamina y una variedad de aminas primarias, incluyendo el grupo ϵ -amino de residuos de lisina. Cuando la enzima actúa sobre una proteína se forman enlaces intra e inter moleculares ϵ -(γ -glutamil)lisina.

La β -LG no es un buen sustrato para la TG. Sin embargo, la reacción se puede facilitar después de la desnaturalización por tratamiento térmico ($> 70 \text{ }^\circ\text{C}$) o por la adición de agentes reductores tales como ditioneitol (DTT), β -mercaptoetanol o cisteína que rompen enlaces disulfuro. La cisteína fue elegida como el agente reductor ya que su uso está permitido para aplicaciones alimentarias, hecho que no ocurre con el DTT o el β -mercaptoetanol [37]. Villas-Boas y col. [37] concluyen que la β -LG polimerizada en presencia de cisteína muestra una menor actividad antigénica que la de la muestra polimerizada después de la desnaturalización térmica. Recientemente también se ha demostrado que la adición de Cys, asociada o no con la polimerización, aumenta la digestibilidad de la β -LG en más de un 20 % en comparación con la no tratada [62].

Al trabajar con aislados del suero lácteo Eissa y col. [63] encontraron drásticas diferencias en la viscosidad de la solución luego de incubar con TG a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, previa desnaturalización de las proteínas con DTT. Recientemente Zhong y col. [64]

polimerizaron el mismo sustrato con TG con el fin de aumentar su estabilidad térmica para un posible uso como ingrediente de bebidas con alto contenido de proteínas de suero lácteo. Por su parte Sharma y col. [65] trataron un concentrado industrial de α -lactoalbumina con TG obteniendo el máximo de entrecruzamiento incubando 5 h a 50 °C.

En base a los conocimientos previos sobre la polimerización de la β -LG por calentamiento y su efecto sobre las propiedades funcionales superficiales se propone un método alternativo de agregación como es la reacción enzimática con TG.

3.2.2. Electroforesis

Soluciones de β -LG tratadas con TG a 30, 60, 120 y 180 min se analizaron por SDS-PAGE (condiciones reductoras) y las diferentes especies de β -LG se cuantificaron por densitometría del gel electroforético. Con el aumento de tiempo de incubación con TG la cantidad de monómeros de β -LG disminuyó y se formaron agregados de varios tamaños: dímeros, trímeros, oligómeros y polímeros (Figura 3.11).

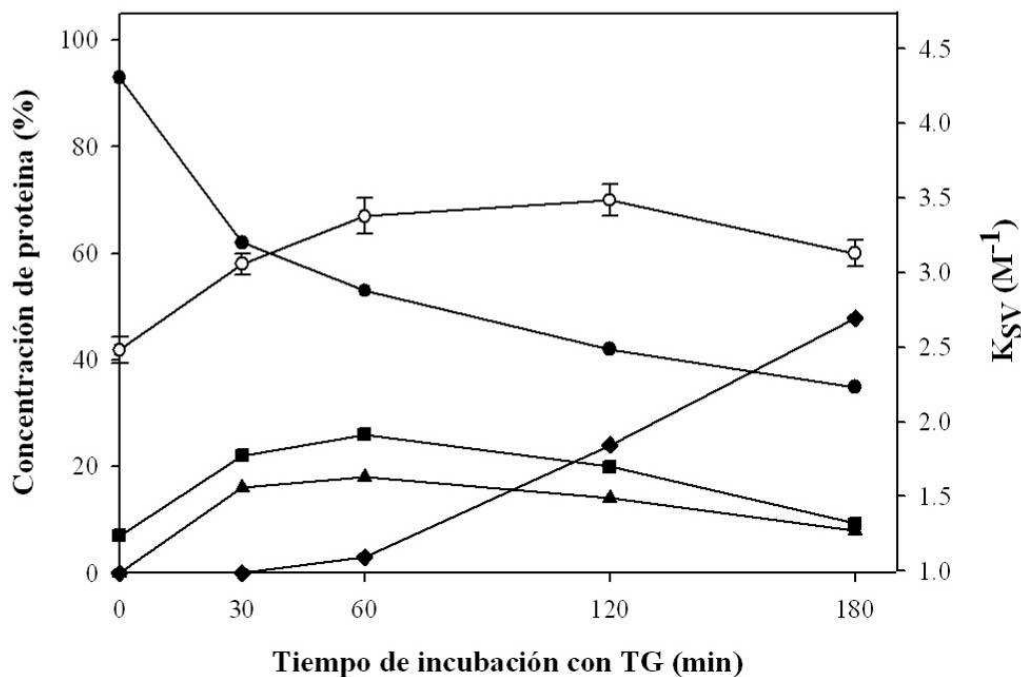


Figure 3.11: Concentración de proteína (%) de las diferentes especies formadas por incubación de soluciones de β -LG (25 mg mL^{-1}) con TG en presencia de Cys $0,07 \text{ M}$, a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, y por diferentes periodos de tiempo: monómeros (●), dímeros (■), trímeros (▲) y agregados que no entraron al gel de corrida (oligómeros y polímeros) (◆). (○) K_{SV} (M^{-1}) obtenida del gráfico de Stern-Volmer a diferentes tiempos de incubación con TG.

A mayores tiempos de incubación disminuyeron las cantidades de dímeros y trímeros mientras que la cantidad de oligómeros y polímeros aumentan bruscamente. A los 60 min de tiempo de incubación con TG, se encuentra la mayor cantidad de dímeros y trímeros, junto a la aparición de oligómeros y polímeros, que representan aproximadamente el 50 % de las especies en solución a 180 min.

De ahora en adelante en esta Tesis, la muestra tratada enzimáticamente con TG durante 60 min se denomina TG- β -LG mientras que la tratada térmicamente a 85 °C durante 3 min se denomina HT- β -LG.

Comparando el tratamiento térmico y la transglutaminación se ha observado que el cambio conformacional más significativo se verificó a los 3 min para el tratamiento térmico y a los 60 min para la transglutaminación. A estos tiempos se encuentran la mayor cantidad de dímeros y trímeros. Por otra parte, se encuentran presente similares proporciones entre las especies tanto en HT- β -LG (monómero 43 %, dímero 36 % y trímero 21 %) como en TG- β -LG (monómero 53 %, dímero 26 %, trímero 18 % y agregados más grandes 3 %) (Figura 3.12).

3.2.3. Extinción de la fluorescencia

La Figura 3.11 también muestra los valores de las pendientes del ajuste lineal del gráfico de Stern-Volmer (K_{SV}) para la β -LG tratada con TG en presencia de Cys para los diferentes tiempos ensayados. El valor inicial de K_{SV} en este gráfico es mayor que el obtenido para β -LG sin tratamiento y en ausencia de Cys (Tabla 3.3), ya que la presencia del agente reductor rompe los enlaces disulfuro, haciendo más fácil la apertura de la estructura de la proteína. La eficacia del proceso de extinción de la fluorescencia, medido a través de los valores K_{SV} , aumentó con la duración del tratamiento enzimático, verificando un valor mínimo para el tiempo inicial, y un máximo después de 60 min de tiempo de incubación con TG. El incremento de K_{SV} durante el tratamiento con TG puede atribuirse a: i) presencia de monómeros no nativos y ii) porcentaje creciente de agregados de bajo peso molecular y estructuras con mayor grado de despliegue.

La ligera disminución en el valor de K_{SV} para 180 min de tiempo de incubación con TG es coherente con la presencia de agregados de pesos moleculares altos cuya estructura podría reducir la accesibilidad al Trp. En consecuencia con los cambios conformacionales más importantes, TG- β -LG y HT- β -LG presentan los máximos valores de K_{SV} .

Tabla 3.3. Estudios de fluorescencia de β -LG tratada en presencia de urea

Tratamiento	K_{SV} (0 M urea) (M^{-1})	K_{SV} (8 M urea) (M^{-1})	$[urea]_{1/2}$ (M)
β -LG ^a	$2,0 \pm 0,2$	$8,1 \pm 0,2$	$4,8 \pm 0,1$
β -LG-Cys ^b	$2,5 \pm 0,2$	$12,0 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,1$
HT- β -LG ^c	$3,7 \pm 0,1$	$10,8 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,1$
TG- β -LG ^d	$3,4 \pm 0,1$	$9,6 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,1$

^a β -LG nativa, ^b β -LG en presencia de Cys 0,07 M, ^c β -LG calentada a 85 °C por 3 min y ^d polimerizada con TG (incubación a 40 °C por 60 min y en presencia de Cys 0,07 M). $[urea]_{1/2}$ está determinado por el perfil de desnaturalización química de especies de β -LG en presencia de urea (0-8 M), suponiendo un modelo de dos estados.

La Tabla 3.3 muestra diferencias entre los valores de K_{SV} para los diferentes tratamientos de la β -LG, los cuales están directamente relacionados con el grado de despliegue. El mínimo valor de K_{SV} se verifica para la β -LG nativa y el máximo para la desnaturalizada químicamente con urea 8 M. A esta concentración de urea la proteína alcanza su mayor grado de desnaturalización. Entre estos extremos, se puede observar que K_{SV} disminuye en el siguiente orden: HT- β -LG > TG- β -LG > β -LG-Cys. Estos resultados indican la presencia de una estructura residual que impide la plena accesibilidad de la acrilamida al Trp en estas especies.

3.2.4. Desnaturalización química por medidas de fluorescencia

La urea, como agente caotrópico, forma puente de hidrógeno y debido a su gran solubilidad y bajo peso molecular puede penetrar en las proteínas. La urea compite por los puentes de hidrógeno con el agua ligada rompiendo las estructuras terciaria y secundaria de la proteína. Este agente desnaturalizante produce la formación de ovillos estadísticos que se estabilizan con puentes de hidrógeno formados con la urea. Los puentes disulfuro no se ven afectados por la urea [1, 16].

La Figura 3.12 muestra F_{des} para las diferentes muestras de β -LG en el intervalo de concentraciones de urea ensayado. Los valores obtenidos de $[urea]_{1/2}$ se incrementan en el siguiente orden: HT- β -LG < TG- β -LG < β -LG-Cys < β -LG, como se observa en la Tabla 3.3. En el caso de β -LG-Cys los cambios conformacionales observados demostraron que la ruptura de los enlaces disulfuro por la Cys como agente reductor no implicaba un extenso despliegue de las moléculas de β -LG.

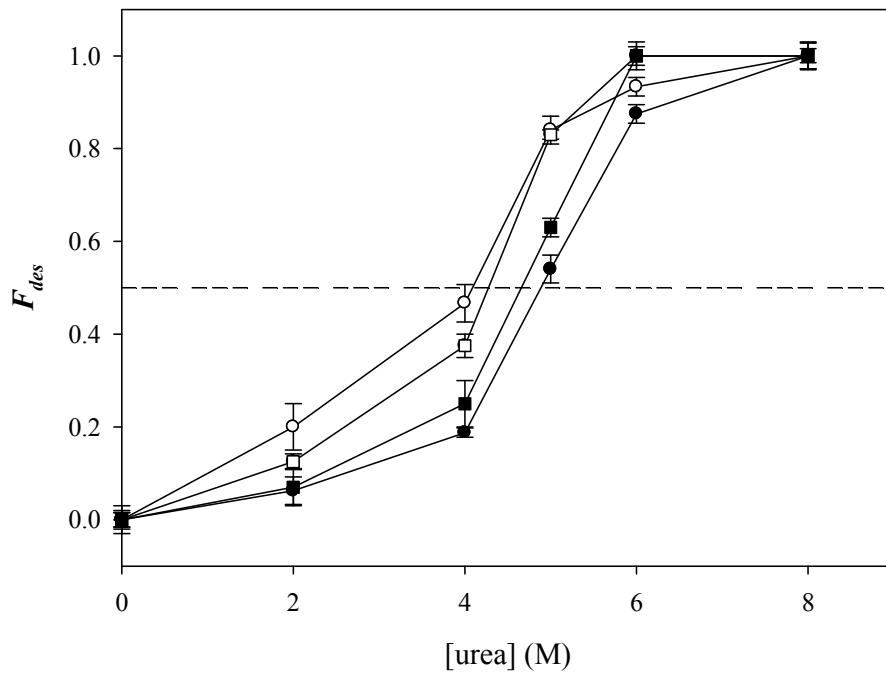


Figura 3.12: Perfil de desnaturalización proteica de diferentes muestras de β -LG, determinados a través de valores de λ_{\max} . (●) β -LG nativa, (■) β -LG-Cys, (○) HT- β -LG y (□) TG- β -LG. $F_{des} = 0,5$ (-).

3.2.5. Dicroísmo circular

El análisis de los espectros de DC en el UV cercano se utilizaron para caracterizar la estructura terciaria de las proteínas, principalmente a causa de las limitaciones de las asimetrías en el medio ambiente de los aminoácidos aromáticos [52]. Los espectros de DC UV cercano para la β -LG tratada con calor o transglutaminasa se encuentran en la Figura 3.13.

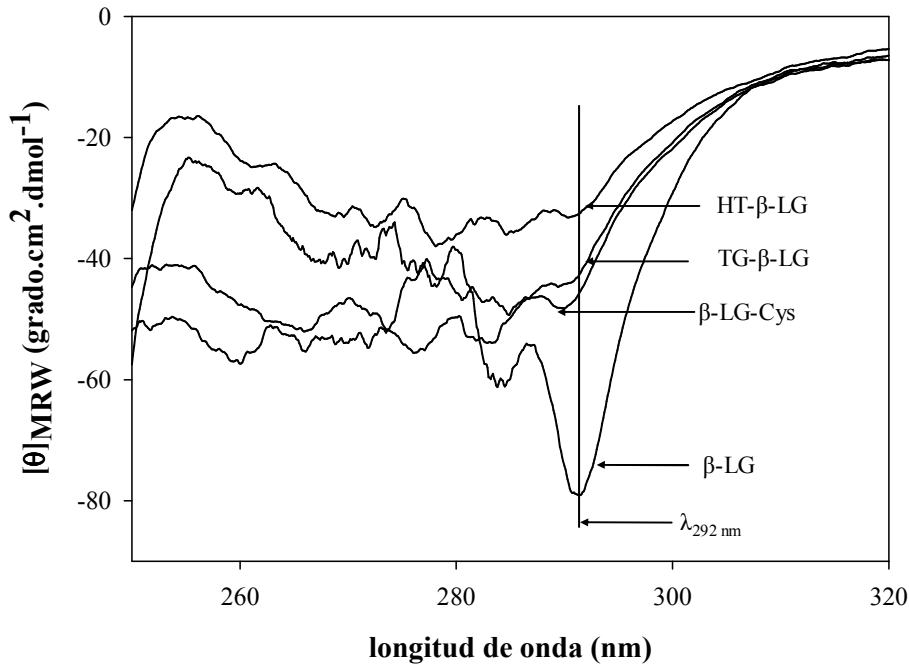


Figura 3.13: Espectros de DC en el UV cercano de la β -LG 25 mg mL^{-1} , pH 6,8, tratada con calor o transglutaminasa. La línea vertical marca la elipticidad molar a una longitud de onda de 292 nm.

Los picos negativos de elipticidad a 285 y 292 nm en los espectros de DC de la β -LG nativa se deben principalmente a la absorbancia del Trp19 [53]. El pico negativo a 292 nm, mostrado en la Figura 3.13 por una línea vertical, disminuye su intensidad con el tratamiento térmico más que para los otros tratamientos, lo que refleja cambios estructurales más importantes dentro del cáliz de la molécula de β -LG, donde se encuentra la cadena de indol del Trp19 [54]. En este trabajo, la señal de DC a 292 nm fue seguida para medir los cambios en la estructura terciaria de proteínas. Aunque la diferencia de intensidad del pico negativo a 292 nm de β -LG-Cys y TG- β -LG fue estadísticamente significativo, esta diferencia fue leve. Probablemente se deba a que la cisteína reduce los puentes disulfuro promoviendo los principales cambios en la estructura terciaria de la proteína.

Los espectros de DC UV lejano reflejan en gran medida la estructura secundaria de las proteínas. Tanto las estructuras secundarias hoja β y hélice α muestran picos de DC por debajo de 200 nm y mínimos en la región de 200 a 235 nm, mientras que las estructuras ovillo estadístico a su vez presentan profundas depresiones cerca de los 200 nm [35]. Los espectros de DC UV lejano para la β -LG tratada con calor o transglutaminasa se encuentran en la Figura 3.14 y las longitudes de onda correspondientes al mínimo de la región de 200 a 235 nm se hallan en la Tabla 3.4.

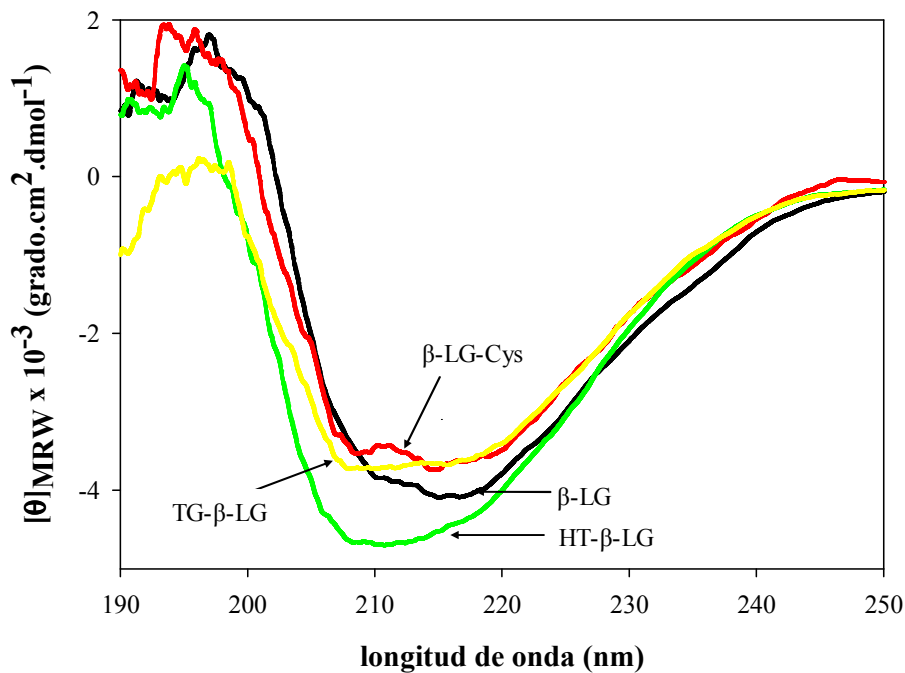


Figura 3.14: Espectros de DC en el UV lejano de la β -LG 25 mg mL^{-1} , pH 6,8, tratada con calor o transglutaminasa.

Como se ha visto en la sección de tratamiento térmico el despliegue de la β -LG nativa promovido por el calentamiento produjo un desplazamiento del $\lambda_{\text{mín}}$ hacia longitudes de onda más cortas en el DC UV lejano. En el caso puntual del tratamiento térmico a $85 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 min (HT- β -LG) se produce un desplazamiento desde los 215,0 nm para la β -LG nativa hacia los 209,8 nm (Tabla 3.4). Este cambio se relaciona con la pérdida de las estructuras hoja β y hélice α con un aumento correspondiente en ovillo estadístico [21, 28]. Por su parte en la transglutaminación (TG- β -LG) se produce un desplazamiento del mínimo hacia 208,9 nm, indicando cambios en la estructura secundaria con aumento en la proporción de ovillo estadístico. El mínimo de la proteína reducida con cisteína (β -LG-Cys) no presenta cambios significativos con respecto a la proteína nativa, mostrando que no promueve cambios significativos en la estructura secundaria debido a que afecta principalmente a la estructura terciaria por la ruptura de puentes disulfuros.

Tabla 3.4: Desplazamiento del pico de la región de los 210-220 nm hacia la de 200-210 nm de la β -LG 25 mg mL⁻¹, pH 6,8, tratada con calor o transglutaminasa.

Tratamiento	λ_{\min} (nm)
β -LG	215,0 \pm 0,2
β -LG-Cys	214,4 \pm 0,3
TG- β -LG	208,9 \pm 0,2
HT- β -LG	209,8 \pm 0,2

3.2.6. Viscosidad intrínseca

La viscosidad intrínseca es una medida del volumen hidrodinámico que ocupa una proteína. La β -LG nativa presentó un valor de viscosidad intrínseca de 3,7 mL g⁻¹ (Tabla 3.5) y un volumen específico parcial anhidro de 0,74 mL g⁻¹, valores que corresponden a una proteína globular y compacta. β -LG-Cys presentó un valor 19 % mayor que la β -LG nativa. Este incremento puede ser debido a un aumento del volumen hidrodinámico de la proteína como consecuencia de la pérdida de estructura causada por la ruptura de enlaces disulfuro [66]. Además, este moderado incremento es coherente con los pequeños cambios de conformación que se encuentran en los estudios de fluorescencia.

Tabla 3.5: Viscosidad intrínseca de diferentes muestras de β -LG tratada con calor o transglutaminasa

Tratamiento	$[\eta]$ (mL g ⁻¹)
β -LG	3,7 \pm 0,2
β -LG-Cys	4,4 \pm 1,3
TG- β -LG	6,0 \pm 0,9
HT- β -LG	9,2 \pm 1,0

El valor más alto de viscosidad intrínseca se obtuvo para HT- β -LG, seguido por un valor inferior para TG- β -LG. Estos resultados son consistentes con los efectos producidos por el calentamiento: i) formación de especies más grandes con mayor fracción de volumen efectivo que las moléculas nativas y ii) formación de agregados más asimétricos con mayor viscosidad. Por otro lado, TG- β -LG genera una estructura

más compacta y agregados más simétricos que conducen a un menor valor de viscosidad intrínseca.

3.2.7. Comparación entre el calentamiento y el tratamiento enzimático

Se han revisado diferentes mecanismos para la desnaturalización térmica y la agregación de la β -LG [67]. Independientemente del mecanismo propuesto algunos eventos deben ser considerados durante el proceso de calentamiento y se discuten a continuación. En primer lugar, un cambio conformacional crítico en el monómero de β -LG que expone el grupo sulfhidrilo libre (Cys121). Este grupo reactivo en la molécula modificada puede inducir reacciones de intercambio tiol/disulfuro que conduce a la formación de agregados enlazados por puentes disulfuro. El enlace disulfuro involucrado en la reacción de intercambio intermolecular sería muy probablemente el Cys66-Cys160 que se encuentra en uno de los bucles externos de β -LG. El otro disulfuro está escondido en partes internas de la proteína y está menos disponible para la reacción [68]. Además de esta agregación por enlaces covalentes disulfuros intermoleculares también pueden estar implicadas interacciones no covalentes (iónicas, de van der Waals e hidrofóbicas). La contribución de interacciones no covalentes va a ser de importancia creciente con valores de pH cercanos al punto isoeléctrico y/o con concentraciones de sal superiores pero éstas no fueron las condiciones del medio ensayadas en el presente trabajo. Por lo tanto, en la primera etapa de desnaturalización/agregación de la β -LG inducida por calentamiento, en ausencia de sal añadida y pH casi neutro, los monómeros desnaturalizados fueron enlazados para formar oligómeros intermedios (di-, tri- y tetrámeros) a través de reacciones intermoleculares disulfuro [69].

La estructura secundaria de la β -LG nativa consta de nueve hojas β (aproximadamente 50 %), hélices α (aproximadamente 15 %), giros (aproximadamente 20 %) y ovillo estadístico (aproximadamente 15 %) [70]. Durante el tratamiento térmico se rompen los puentes de hidrógeno que estabilizan la estructura nativa de β -LG, causando una pérdida de estructuras hélice α y hojas β , aumentando la exposición de residuos hidrofóbicos al disolvente [21, 28].

El tratamiento con TG promueve la formación de enlaces ϵ -(γ -glutamil)lisil y la agregación de la proteína, dando lugar a especies de alto peso molecular. En el caso de aplicar ambos tratamientos, calentamiento y luego polimerización enzimática con TG,

Eissa y col. [63] sugieren que se han creado un bajo número de enlaces, a pesar del potencial número de estos que podría estar formando de acuerdo con los residuos de glutamina y lisina presentes en la β -LG (los residuos de glutamina y lisina por β -LG son 9 y 15, respectivamente).

Basándose en los resultados se puede concluir que, cuando se comparan ambos tratamientos, HT- β -LG produce un mayor grado de despliegue de la proteína con una mayor exposición de los residuos hidrofóbicos al disolvente que conduce a un mayor índice de hidrofobicidad superficial, una estructura menos compacta y una forma más asimétrica de los oligómeros formados. Las diferentes estructuras posibles se esquematizan en la Figura 3.15.

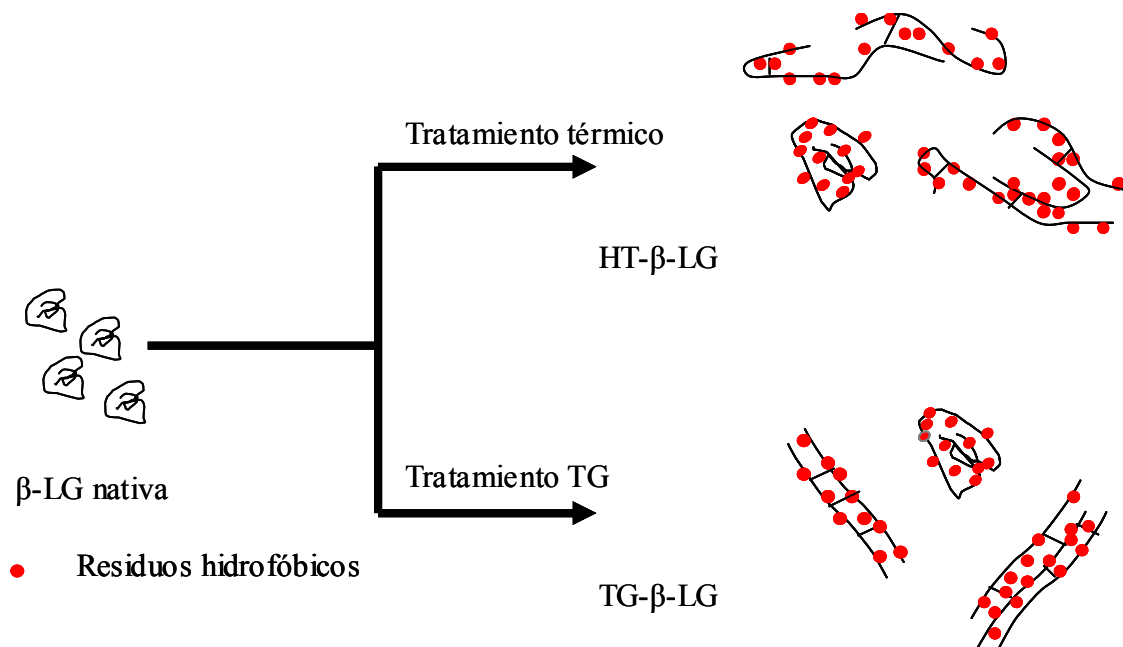


Figura 3.15: Posibles estructuras de diferentes especies de β -LG producidas por calentamiento y tratamiento con TG.

3.2.8. Espumas

Hay dos fases distintas en la existencia de una espuma: i) la eficacia de la encapsulación de gas (actividad espumante) y (ii) el tiempo de vida de la espuma (estabilidad espumante) [46, 60].

El incremento de la capacidad espumante producido por un aumento en la HS de la proteína ha sido ampliamente estudiado [56, 60]. Proteínas desordenadas, más pequeñas y flexibles son agentes superficiales más eficaces para la formación de espuma que las ordenadas, grandes y rígidas. Cuanto mayor sea el grado de

desnaturalización que sufre una proteína, mayor es la HS. Esto conduce a una mayor afinidad de la proteína por la interfase permitiendo superar la barrera de energía contra la adsorción, desplegándose en la interfase mientras que las proteínas están muy próximas [46]. También se promueve una rápida disminución de la tensión superficial dando lugar a un aumento de la actividad espumante de la proteína.

La Figura 3.16 muestra los efectos del tratamiento con TG en la actividad espumante estimada por la densidad de la espuma (DE) relativa a la proteína sin tratar (DE/DE°). Se puede observar que se ha mejorado la actividad espumante un 30 % para todos los tiempos de incubación con TG ensayados. Tanto la electroforesis como la fluorescencia han demostrado que el tratamiento con TG produce agregados de alto peso molecular con una mayor exposición de los residuos hidrofóbicos de la β -LG nativa. Estas dos características tienen efectos opuestos sobre la actividad espumante. Mientras que los agregados tienen un coeficiente de difusión menor, lo que dificulta la formación de espuma, los sitios hidrofóbicos expuestos la favorecen. Considerando los resultados, aunque el tratamiento TG mejora la actividad espumante, fue independiente del tiempo de incubación con la enzima, ya que la mejora se logró independientemente del tiempo de tratamiento con TG. Es probable que los efectos descritos anteriormente, opuestos entre sí, se compensen y la capacidad espumante permanezca constante.

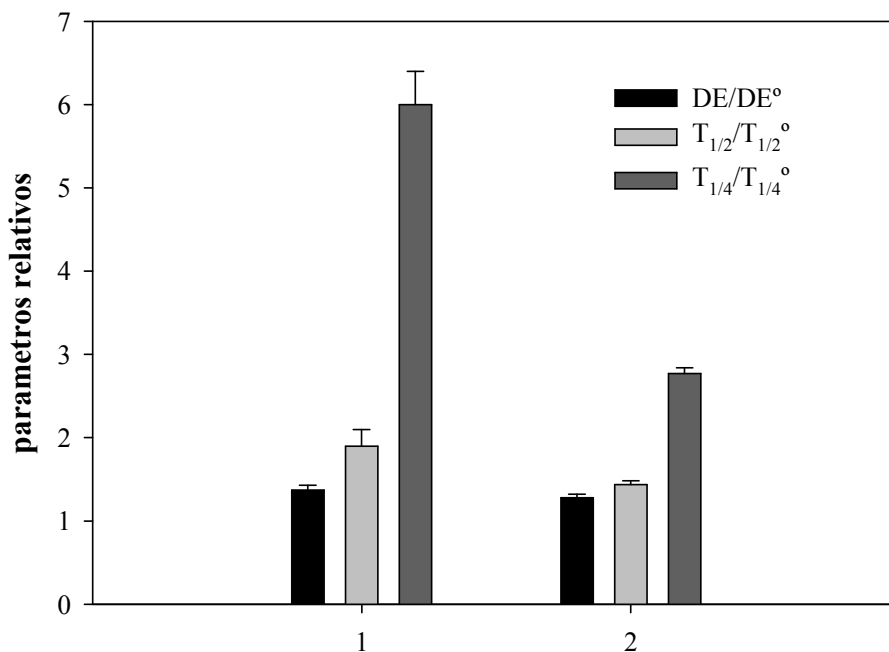


Figura 3.16: Variación relativa a la proteína sin tratar de la densidad de la espuma (DE/DE°), tiempo medio de drenaje ($T_{1/2}/T_{1/2}^\circ$) y tiempo cuarto de colapso ($T_{1/4}/T_{1/4}^\circ$) para HT- β -LG (1) y TG- β -LG (2).

Durante la formación de espuma las burbujas de gas están rodeadas por una película interfacial de proteínas que aseguran la protección de la espuma contra la desestabilización. Los procesos implicados en la desestabilización de espuma son: drenaje de líquido, adelgazamiento de las superficies adyacentes de burbujas y posterior rotura de la película (coalescencia) además de la difusión del gas en la fase continua (maduración de Ostwald o desproporción) resultando en engrosamiento de la burbuja. Todos estos mecanismos ocurren simultáneamente después de que se detiene el burbujeo de aire. Mientras que el drenaje y la coalescencia prevalecerán al principio, cuando las burbujas son principalmente esféricas, la desproporción es más importante en etapas avanzadas, cuando las burbujas son poliédricas. Finalmente la espuma colapsa.

La estabilidad espumante, estimada a través de los valores de $T_{1/2}$ y $T_{1/4}$, se incrementa en diferentes grados en comparación con la β -LG nativa para todos los tiempos de incubación con TG estudiados (Figura 3.17). El tiempo de vida media de drenado, $T_{1/2}$, verifica un incremento del 35 % sobre todo el rango de tiempos de incubación. Este incremento en la estabilidad puede ser explicado por la presencia de agregados desnaturalizados de β -LG con alto volumen hidrodinámico, los cuales producen una mayor viscosidad de la solución proteica disminuyendo la velocidad de drenado [60]. Considerando los resultados observados, aunque el tratamiento enzimático mejora la estabilidad, cuando esta propiedad espumante es medida a través de $T_{1/2}$, el tiempo de incubación con TG no la afectó

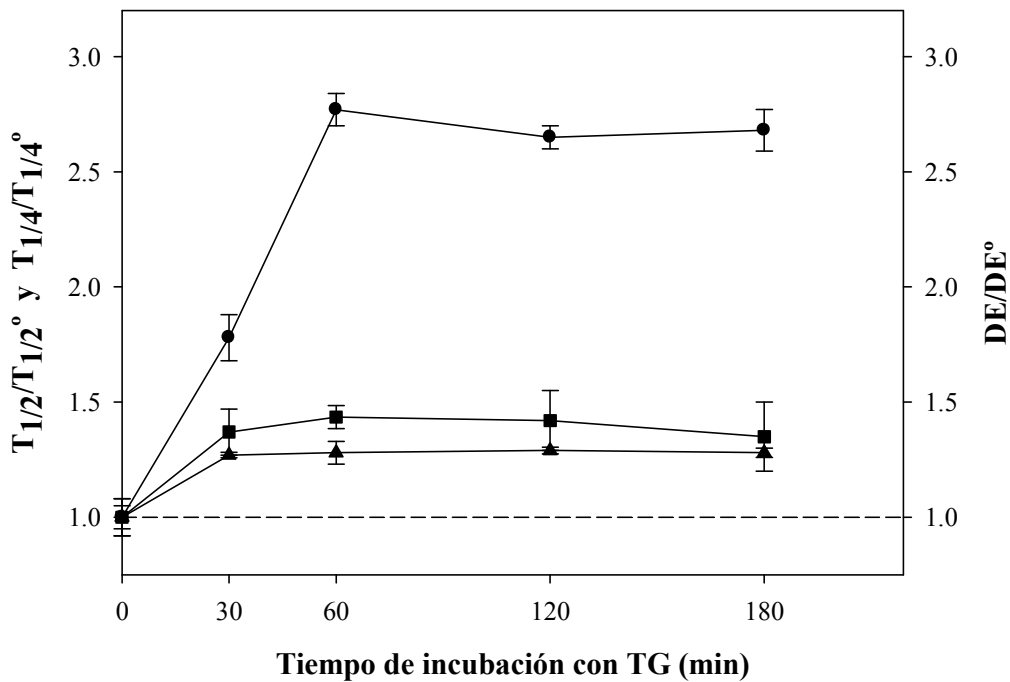


Figura 3.17: Variación de la densidad de espuma (DE/DE°) (▲), tiempo de vida media de drenaje ($T_{1/2}/T_{1/2}^{\circ}$) (■) y tiempo cuarto de colapso ($T_{1/4}/T_{1/4}^{\circ}$) (●) para TG-β-LG.

Por otro lado, $T_{1/4}$, el tiempo requerido para un decaimiento de 25 % de volumen máximo de espuma, aumentó aún más que $T_{1/2}$ en el mismo intervalo de tiempo de incubación con TG. Por lo tanto, con el tratamiento enzimático de hasta 180 min, apareció un pico a los 60 min y se mantuvo constante durante todo el rango de tiempo siguiente. A los 60 min el incremento fue de aproximadamente 275 % y coincidió con los cambios de conformación más significativos de la β-LG. Este hecho refleja la estrecha relación entre la estabilidad espumante con los cambios estructurales de la proteína. Los agregados formados por tratamiento TG entre 60 y 180 min llevaron a espumas más estables, disminuyendo la desproporción debido a la formación de películas más rígidas que resisten la compresión y reducen la difusión de gas.

3.2.9. Comparación entre tratamiento térmico y enzimático con TG

La Figura 3.16 muestra la comparación entre los parámetros espumantes relativos para los dos tratamientos estudiados en esta sección. Ya se ha discutido que hay algunos tiempos particulares a los cuales los tratamientos condujeron a una similar proporción de especies moleculares: 3 min en el tratamiento térmico (HT-β-LG) y 60 min en el tratamiento enzimático (TG-β-LG). Mientras la DE y el $T_{1/2}$ alcanzaron

valores similares sin importar el tratamiento, $T_{1/4}$ para HT- β -LG es aproximadamente 250 % superior a $T_{1/4}$ para TG- β -LG.

Como se ha mencionado anteriormente, la viscosidad intrínseca de la proteína tiene una influencia directa en la viscosidad de la solución, que es el factor más importante en el mecanismo de desestabilización por drenaje, calculada a través de $T_{1/2}$. Por lo tanto, un incremento en la viscosidad hace que disminuya el drenaje y aumente la estabilidad de la espuma. Esta es la razón de por que la mayor estabilidad de la espuma se observó en las muestras calentadas, que presentan una mayor viscosidad intrínseca en comparación con las muestras tratadas enzimáticamente (Tabla 3.5). Además, los agregados formados por calentamiento producen una película rígida que conducen a espumas más estables. En este último caso estabilizan la espuma a través de disminuir la desproporción, lo cual afecta a $T_{1/4}$. Ambos efectos dan lugar a la misma consecuencia: espumas más estables.

Como se explicó, el parámetro $[\text{urea}]_{1/2}$ para TG- β -LG fue superior a la $[\text{urea}]_{1/2}$ para HT- β -LG. Así, HT- β -LG parece tener la estructura química más abierta y, por lo tanto, exhibe una mayor flexibilidad y una mayor capacidad de reordenamiento en la interfase. Croguennec y col [58] sugirieron que las fuerzas que intervienen en la formación de la capa de proteínas adsorbidas podrían ser puentes de hidrógeno, asociaciones hidrófobas e interacciones electrostáticas en lugar de los enlaces disulfuros formados por reacciones de intercambio de disulfuro/sulfhidrilo. Los estudios de fluorescencia de la presente Tesis mostraron un mayor grado de hidrofobicidad superficial (Tabla 3.3) para HT- β -LG que para TG- β -LG. En vista de estos resultados, la mayor estabilidad de la espuma alcanzada por el tratamiento térmico puede ser debido a las interacciones entre los nuevos sitios hidrófobos que conducen a la formación de una película viscoelástica más rígida. Por lo tanto, la exposición de sitios hidrófobos permite interacciones hidrofóbicas que se convirtieron en los más importantes.

Se ha observado que la HS se mantuvo constante después del tiempo crítico de calentamiento (3 min) y la estabilidad de la espuma, medida a través de $T_{1/4}$, cae abruptamente después de este tiempo. En estos momentos, los oligómeros y polímeros de alto peso molecular alcanzan una proporción del 65 % de las especies que producen un impedimento estérico que condujo a la formación de una película interfacial más débil, responsable del decaimiento de la estabilidad espumante. Cuando la muestra se trató enzimáticamente con TG la HS se mantuvo aproximadamente constante después

del tiempo crítico (60 min) y $T_{1/4}$ también fue constante para los diferentes tiempos de tratamiento. En este caso, la proporción de oligómeros y polímeros de alto peso molecular sólo alcanzó el 48 % entre las especies presentes, y no pudieron haber afectado a la película interfacial tanto como lo hicieron en el tratamiento térmico. Por lo tanto, al no decaer la estabilidad espumante, prevalece la HS como uno de los factores más importantes que determinan la estabilidad espumante.

3.3. Polimerización de la β -LG con transglutaminasa y posterior hidrólisis con tripsina

3.3.1. Conocimientos previos

En el capítulo previo se estudió la polimerización enzimática con TG de la β -LG. La acción enzimática de la TG sobre la β -LG puede ser optimizada previa reducción de los puentes disulfuro usando cisteína. El tratamiento con TG promueve la formación de enlaces ϵ -(γ -glutamil)lisil y la agregación de la proteína, dando lugar a especies de mayor peso molecular, más desplegadas y mayor exposición de los residuos hidrofóbicos. Esto conduce a un mayor índice de hidrofobicidad superficial, una estructura menos compacta y una forma más asimétrica que la proteína nativa posibilitando una mejora en las propiedades espumantes. Mientras que la actividad espumante mejoró aproximadamente un 30 % su estabilidad lo hizo en un 250 %.

Según Ballerini [11] la hidrólisis enzimática con tripsina a pH 8,0 en fase homogénea de soluciones de β -LG, inactivando la enzima con 5 min a 85 °C, genera espumas más estables a tiempos cercanos a la hora de tratamiento. Por su parte Davis y col. [71] demostraron que los hidrolizados con tripsina de β -LG, inactivando la enzima con 30 min a 75 °C o 15 min a 90 °C, son adsorbidos en la interfase aire/agua más rápidamente que la β -LG no hidrolizada. Esto evidencia su capacidad para disminuir la tensión interfacial y, por lo tanto, explica porqué mejora su capacidad como espumante. Con respecto a las modificaciones en la alergenicidad de las proteínas hidrolizadas enzimáticamente se sabe que generalmente se reduce [51].

En este apartado se estudia la combinación de tratamientos enzimáticos (transglutaminación e hidrólisis) que consiste en los siguientes tratamientos de la β -LG: i) reducción con Cys, ii) polimerización con TG e iii) hidrólisis con tripsina a pH 8.

3.3.2. Determinación del grado de hidrólisis

Se determinó el grado de hidrólisis (GH) de cada una de las muestras tratadas enzimáticamente según protocolo (Sección 2.5.1. de Materiales y Métodos). La curva estándar de L-Leu se muestra en la Figura 3.18 y los datos se ajustaron por regresión lineal

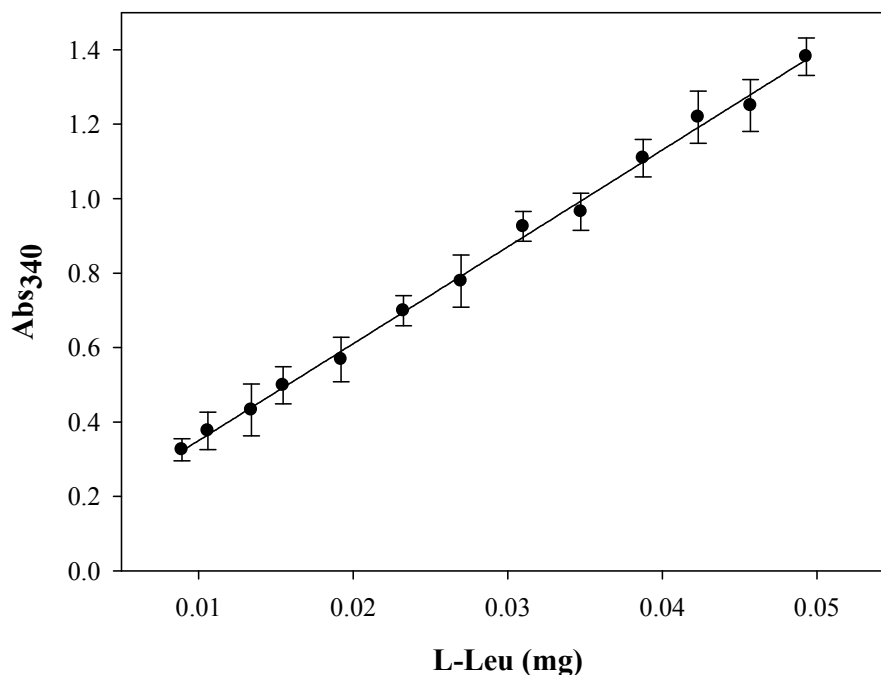


Figura 3.18: Curva estándar de L-Leu utilizada para la determinación del grado de hidrólisis

La ecuación lineal ajustada es:

$$\text{Abs}_{340} = 26,09 \text{ mg L-Leu} + 0,084$$

Cuyo coeficiente de regresión (R^2) es 0,9974.

Se determinó que el 100 % de hidrólisis corresponde a 0,046 mg de L-Leu, equivalentes a una masa de 0,05 mg de β -LG.

Se aplicó el método del TNBS a cada una de las muestras hidrolizadas. En la Tabla 3.6 se detallan los resultados para los distintos tiempos de hidrólisis ensayados ya que el GH resultó ser función únicamente del tiempo de hidrólisis.

Tabla 3.6: Porcentaje de grado de hidrólisis de β -LG 25 mg mL⁻¹, pH 6,8, para β -LG tratada enzimáticamente con transglutaminasa y tripsina. GH es independiente del tiempo de transglutaminación.

Tiempo de hidrólisis	GH (%)
30 min	4,4 ± 0,2
60 min	5,7 ± 0,2
90 min	6,4 ± 0,3

La tripsina ataca preferentemente a partir del extremo carboxilo terminal de los residuos de Lys y Arg, excepto cuando a estos aminoácidos se une una Pro. La

estructura primaria de β -LG (Figura 1.10) está integrada por quince residuos de Lys y tres Arg. Como el residuo Lys₄₇ está seguido por Pro₄₈, la β -LG cuenta con 17 sitios posibles de ruptura que corresponden a un máximo esperado de 10,56 % de GH [11]. En la Tabla 3.6 se observa que la velocidad de hidrólisis durante los primeros 30 min es mayor que a los tiempos superiores. Esta disminución en la velocidad del GH (%) puede deberse a la reducción de los posibles sitios de ataques por parte de la tripsina. Debido a esto se supone que es necesario poco tiempo de hidrólisis con tripsina para producir los mayores cambios con respecto a la estructura primaria de la proteína.

3.3.3. Dicroísmo circular

El análisis de los espectros de DC en el UV cercano se utilizaron para caracterizar la estructura terciaria de las proteínas, principalmente a causa de las limitaciones de las asimetrías en el medio ambiente de los aminoácidos aromáticos [52]. Los efectos de la transglutaminación e hidrólisis de soluciones de β -LG 25 mg mL⁻¹ en los espectros de DC UV cercano se muestran en la Figura 3.19. TG-H- β -LG simboliza a la polimerización con transglutaminasa durante 60 min y posterior hidrólisis con tripsina durante 60 min.

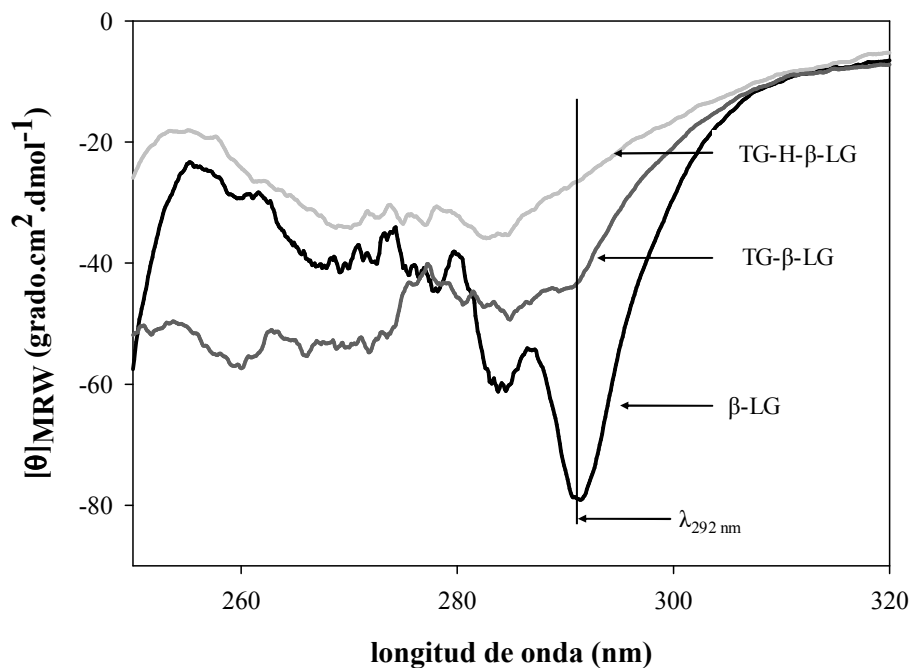


Figura 3.19: Espectros de DC en el UV cercano de la β -LG 25 mg mL⁻¹, pH 6,8, tratada enzimáticamente con transglutaminasa y tripsina.

Los picos negativos de la elipticidad a 285 y 292 nm en los espectros de DC de nativa se deben principalmente a la absorbancia del Trp19 [53]. En este trabajo, la señal de DC a 292 nm fue seguida para medir los cambios en la estructura terciaria de proteínas.

El pico negativo a 292 nm, mostrado en la Figura 3.19 por una línea vertical, disminuye su intensidad con la posterior hidrólisis con tripsina (TG-H- β -LG) más que para la polimerización con transglutaminasa (TG- β -LG), lo que refleja cambios estructurales más importantes dentro del cáliz de la molécula de β -LG, donde se encuentra la cadena de indol del Trp19 [54]. Independientemente del tiempo de polimerización con transglutaminasa o hidrólisis con tripsina ensayados las gráficas fueron muy similares a las obtenidas para TG-H- β -LG. Esto se puede deber a la rapidez con que la tripsina hidroliza promoviendo cambios en la estructura terciaria de la proteína.

Los espectros de DC UV lejano reflejan en gran medida la estructura secundaria de las proteínas. Tanto las estructuras secundarias hoja β y hélice α muestran picos de DC por debajo de 200 nm y mínimos en la región de 200 a 235 nm, mientras que las estructuras ovillo estadístico a su vez presentan profundas depresiones cerca de los 200 nm [35]. Los efectos de la transglutaminación e hidrólisis de soluciones de β -LG 25 mg mL⁻¹ en los espectros de DC UV lejano se muestran en la Figura 3.20 y las longitudes de onda correspondientes al mínimo de la región de 200 a 235 nm se hallan en la Tabla 3.7.

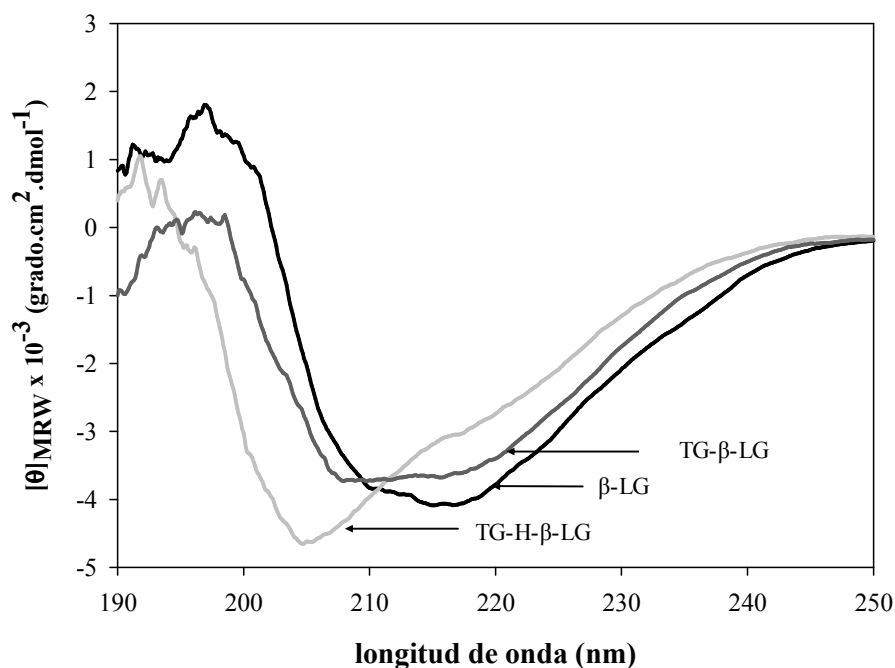


Figura 3.20: Espectros de DC en el UV lejano de la β -LG 25 mg mL^{-1} , pH 6,8, tratada enzimáticamente con transglutaminasa y tripsina.

Como se ha visto en la sección del tratamiento con TG la apertura de la estructura de la β -LG nativa promovida por la polimerización/desplegado produjo un desplazamiento del λ_{min} hacia longitudes de onda más cortas en el DC UV lejano. El pico negativo (λ_{min}) se desplaza de la región de los 215 nm para la β -LG nativa hacia 209 nm para TG- β -LG y 205 nm para TG-H- β -LG (Tabla 3.7). Este cambio se relaciona con la pérdida de las estructuras hoja β y hélice α con un aumento correspondiente en ovillo estadístico [21, 28].

Tabla 3.7: Desplazamiento del pico de la región de los 210-220 nm hacia la de 200-210 nm de la β -LG 25 mg mL^{-1} , pH 6,8, para β -LG tratada enzimáticamente con transglutaminasa y tripsina.

Tratamiento	λ_{min} (nm)
β -LG	215
TG- β -LG	209
TG-H- β -LG	205

3.3.4. Electroforesis

En la Figura 3.21 se encuentra el gel electroforético de la β -LG tratada enzimáticamente con TG y tripsina. Las calles 1, 2 y 3 corresponden a β -LG nativa, TG- β -LG y TG-H- β -LG respectivamente. Mientras que en la calle 1 se observa un claro predominio de monómero por sobre otras especies, en la 2 aparecen especies de mayor peso molecular. Por último, en la calle 3 se observa disminución en la proporción de monómeros y la desaparición de los dímeros formados en polimerización con TG. Recordando que los agregados formados por tratamiento TG se consideraron responsables del aumento de la estabilidad espumante, se supone que la hidrólisis de estas especies sea la responsable de la pérdida de la estabilidad con la posterior hidrólisis.

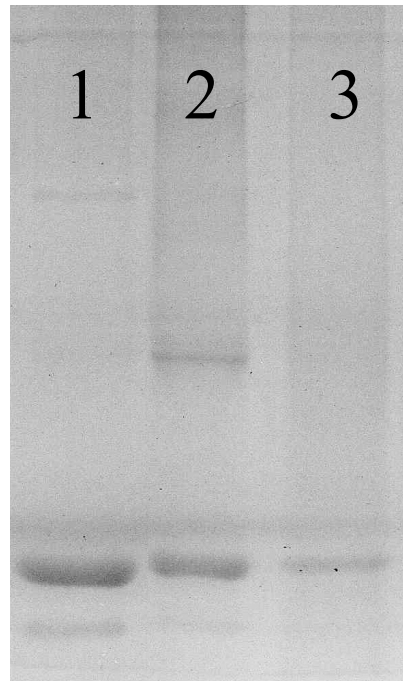


Figura 3.21. Electroforesis de polimerización con transglutaminasa y posterior hidrólisis de la β -LG. Las calles 1, 2 y 3 corresponden a β -LG nativa, TG- β -LG y TG-H- β -LG respectivamente

3.3.5. Propiedades espumantes

Hay dos fases distintas en la existencia de una espuma: i) la eficacia de la encapsulación de gas (actividad espumante) y (ii) el tiempo de vida de la espuma (estabilidad espumante) [46, 60].

Los factores ensayados fueron: i) tiempo de polimerización con TG (tTG) a tres niveles (20, 60 y 100 min) y ii) tiempo de hidrólisis con tripsina (tH) a tres niveles (30,

60 y 90 min). La Tabla 3.8 muestra los resultados del análisis de la variancia (ANOVA) de las espumas de β -LG tratada enzimáticamente con transglutaminasa y tripsina para los parámetros DE, $T_{1/2}$, T_{C10} y $T_{1/4}$. En rojo se muestran los valores $p < 0,05$.

Tabla 3.8: Significancia estadística (valor p) correspondiente a cada término del modelo ajustado para las espumas de β -LG tratada enzimáticamente con transglutaminasa y tripsina.

Término	DE	$T_{1/2}$	T_{C10}	$T_{1/4}$
tTG	0,5778	0,5907	0,1102	0,2641
tH	0,3036	0,1327	0,0001	0,0006
tTG x tTG	0,1338	0,6021	0,5458	0,9372
tTG x tH	0,6533	0,9335	0,0491	0,2389
tH x tH	0,3502	0,5358	0,0451	0,1697
R²	45,70	39,45	96,47	93,18

Los valores de R^2 de la tabla ANOVA indican que el modelo ajusta aceptablemente para los parámetros T_{C10} y $T_{1/4}$. En la misma tabla se muestra que el término tH tiene un efecto significativo sobre la estabilidad con un valor $p < 0,05$.

Para determinar si el efecto del término tH es favorable o desfavorable para la estabilidad de la espuma, medido a través de T_{C10} y $T_{1/4}$, se realizaron los gráficos de Pareto y Superficie de respuesta.

El diagrama de Pareto es una gráfica para organizar los términos en orden descendente según su contribución a un determinado efecto. Aquellos términos que sobrepasan la línea vertical son los significativos y pueden tener un efecto positivo o negativo sobre el parámetro estudiado. Por otra parte la superficie de respuesta se visualiza en un espacio tridimensional dado que hay dos factores estudiados. En el mismo se establecen los factores que optimizan o minimizan el valor de la variable respuesta.

Al analizar el parámetro $T_{1/4}$ mediante su diagrama de Pareto (Figura 3.22) se observa el término tH es el único significativo, ya que sobrepasa la línea vertical, y presenta un efecto negativo sobre $T_{1/4}$. Este hecho nos muestra que un aumento del tiempo de hidrólisis con tripsina a pH 8 empeora la estabilidad espumante estimada por el $T_{1/4}$

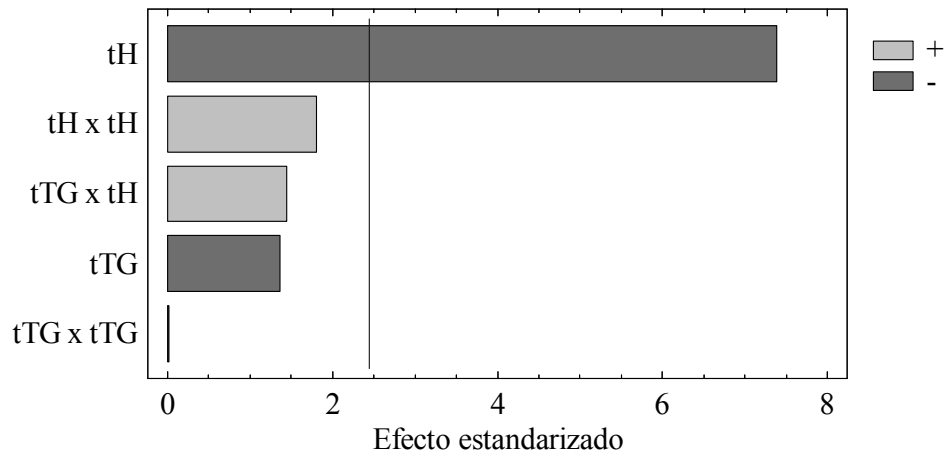


Figura 3.22: Diagrama de Pareto para $T_{1/4}$ para las espumas de β -LG tratada enzimáticamente con transglutaminasa y tripsina.

Continuando el análisis sobre el parámetro $T_{1/4}$ en la Figura 3.23 se presenta la superficie de respuesta en la que se observa el comportamiento de $T_{1/4}$ con los factores tH y tTG . Se aprecia como al aumentar el tiempo de hidrólisis disminuye el parámetro $T_{1/4}$. Esto indica que un aumento del tiempo de la hidrólisis posterior a la transglutaminación conlleva pérdida de la estabilidad de la espuma. Con respecto al tiempo de transglutaminación no hay cambios significativos en $T_{1/4}$. La gráfica de superficie de respuesta muestra que se logra mayor estabilidad, medido a través de $T_{1/4}$, a bajos tiempos de tratamientos enzimáticos. El análisis de la superficie de respuesta coincide con lo visto en el diagrama de Pareto.

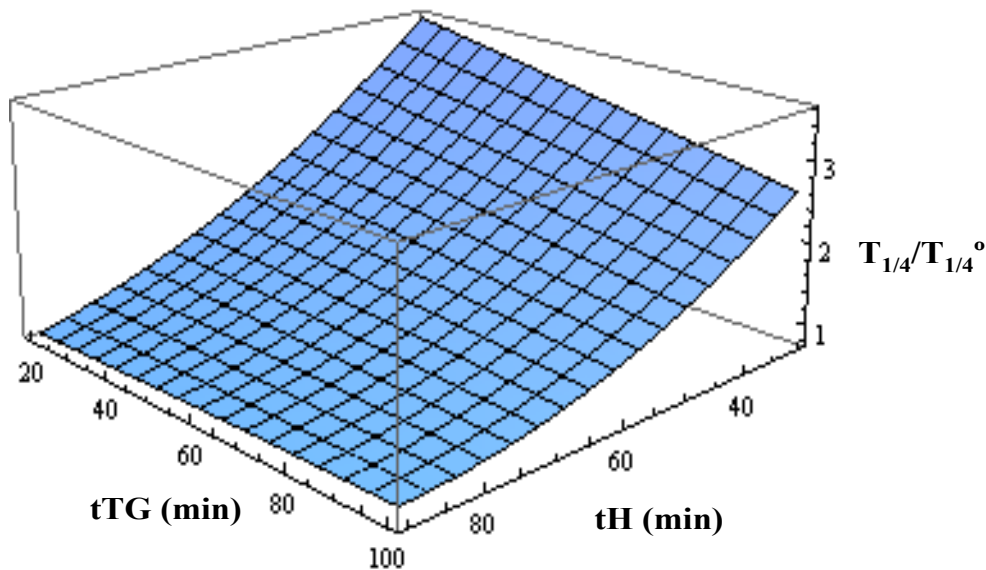


Figura 3.23: Superficie de respuesta para $T_{1/4}$ para las espumas de β -LG tratada enzimáticamente con transglutaminasa y tripsina. $T_{1/4}$ es informado como proporción relativa a la β -LG nativa ($T_{1/4}^{\circ}$).

Al analizar el parámetro T_{C10} mediando su diagrama de Pareto (Figura 3.24) se observa que el término tH es significativo y presenta un efecto negativo sobre T_{C10} . Si bien los términos (tTG x tH) y (tH x tH) tienen un valor p levemente menor 0,05 al ser tan cercano a 0,05 no se los considera como significativos. Analizando la superficie de respuesta de la Figura 3.25 se confirman los resultados y discusiones realizados a través de $T_{1/4}$.

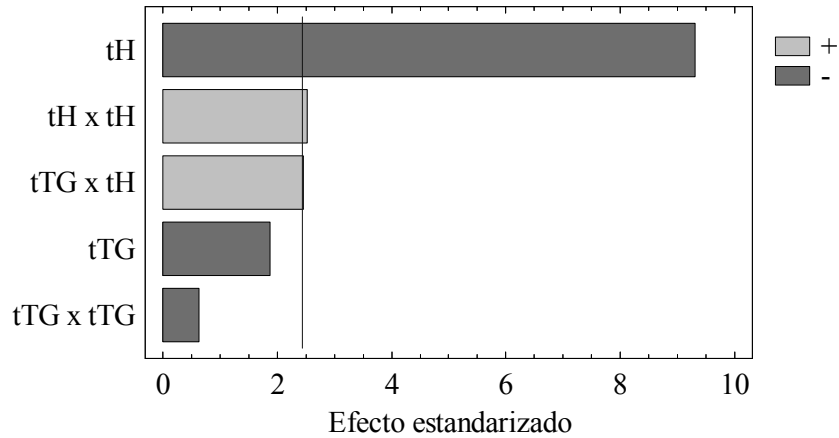


Figura 3.24: Diagrama de Pareto para T_{C10} para las espumas de β -LG tratada enzimáticamente con transglutaminasa y tripsina.

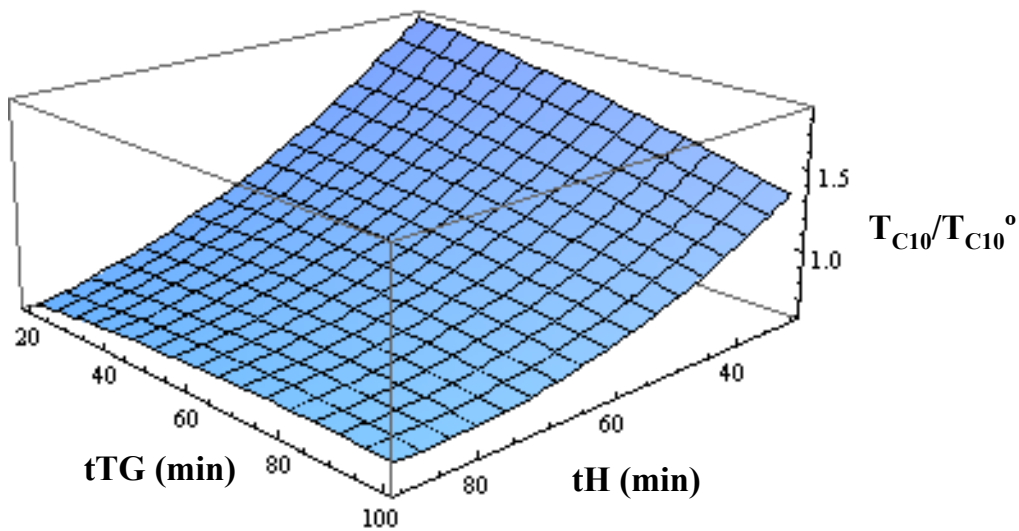


Figura 3.25: Superficie de respuesta para T_{C10} para las espumas de β -LG tratada enzimáticamente con transglutaminasa y tripsina. T_{C10} es informado como proporción relativa a la β -LG nativa (T_{C10}°).

3.4. Glicosilación y tratamiento térmico. Efecto en las propiedades espumantes.

3.4.1. Conocimientos previos

La desnaturalización parcial de las proteínas a menudo mejora su capacidad emulsionante y espumante debido a un aumento de su hidrofobicidad superficial y flexibilidad molecular [21]. A pesar de esto, se ha demostrado que el tratamiento térmico de β -LG en solución estabiliza las espumas pero desestabiliza las emulsiones. Aunque en el estudio sobre las espumas la hidrofobicidad superficial de β -LG fue reconocida como el principal factor influyente para mejorar la capacidad espumante no lo fue en el estudio de las emulsiones. La actividad emulsionante no se vio afectada en la misma medida y la hidrofobicidad superficial no era lo suficientemente importante como para compensar la presencia de agregados de mayor peso molecular que pueden ser los responsables de la menor actividad emulsionante.

Chevalier y col. [32] realizaron un completo estudio de la glicosilación sobre la β -LG de distintos azúcares logrando mejorar las propiedades espumantes con glucosa y galactosa como azúcares reductores. En el mencionado trabajo la reacción fue realizada en solución. Por su parte Jiménez-Castaño y col. [23] glicosilaron proteínas de suero lácteo (α -LA, β -LG y ASB) con dextrano de 10 y 20 kDa de peso molecular, cuya unión logró mejorar la solubilidad de las tres proteínas y la estabilidad al calor de β -LG y ASB.

Las modificaciones de la β -LG producto de la reacción de Maillard demostraron que reduce el potencial alergénico de la proteína, posiblemente debido a que la glicosilación enmascara los epítopos. Sin embargo, estas modificaciones también parecen proteger a la β -LG durante la digestión gástrica simulada lo cual podría promover su alergenicidad [72].

En este apartado de Tesis se investigaron las conformaciones secundarias y terciarias de β -LG modificada por tratamiento térmico y/o glicosilación con glucosa, además del efecto sobre las propiedades espumantes.

3.4.2. Electroforesis

Las muestras tratadas y los respectivos controles fueron analizados por electroforesis SDS-PAGE (condiciones no reductoras) y las diferentes especies se

cuantificaron por densitometría gel y se detallan en la Tabla 3.9. Puede observarse que β -LG_{control} contiene una proporción ligeramente mayor de dímeros y la presencia de pequeñas cantidades de trímeros en comparación con β -LG no tratada. La formación de estos agregados puede ser atribuido a reacciones de intercambio tiol/disulfuro producidos por el tratamiento térmico (96 h a 50 °C). La glicosilación de la proteína (GLI- β -LG) produjo pequeñas cantidades de oligómeros, indicando que este proceso promovió la agregación de la proteína. Una tendencia similar se observó cuando se analizó el comportamiento electroforético de las muestras HT- β -LG, HT- β -LG_{control} y HT-GLI- β -LG. Sin embargo, en este último caso, la abundancia relativa de los oligómeros fue superior a los obtenidos para β -LG, β -LG_{control} y GLI- β -LG.

Tabla 3.9. Contenido de monómeros, dímeros, trímeros y oligómeros de las diferentes muestras de β -LG, determinada por electroforesis SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras

Muestra	monómeros (%)	dímeros (%)	trímeros (%)	oligómeros (%)
β -LG	88	12	-	-
β -LG _{control}	80	18	2	-
GLI- β -LG	76	19	3	2
HT- β -LG	49	34	17	-
HT- β -LG _{control}	42	30	17	11
HT-GLI- β -LG	38	27	19	16

Los resultados obtenidos para la β -LG glicosilada no concuerdan con lo señalado por Medrano y col. [25] quienes utilizaron igual temperatura y tiempo de reacción (96 h a 50 °C). En este último trabajo, la unión de glucosa produjo una importante cantidad de agregados (aproximadamente 30 % de tetrámeros y octámeros). Esta diferencia puede ser atribuida a la presencia de aproximadamente un 56 % de especies agregadas en el aislado de la proteína no tratada utilizado en todo los experimentos realizados por los citados autores (44 % de monómero, 50 % de dímero, 3 % de tetrámero y 3 % de octámero).

Además, en la presente Tesis, los azúcares libres se eliminaron por ultrafiltración con solución reguladora fosfato 20 mM, pH 6,8, mientras que Medrano y col. [25] utilizaron carbonato de amonio 20 mM para la diálisis. Se ha observado que el pH del carbonato de amonio 20 mM es cercano a 9,5. Por encima de pH 9,0 la β -LG sufre un

desplegado irreversible [73]. Es posible que este cambio contribuya a la presencia en calidad y cantidad de las especies formadas en ambos trabajos.

Por otro lado, la menor movilidad electroforética observada de proteínas glicosiladas (Figura 3.26) se explica por el mayor peso molecular de las distintas especies que contenían glucosa unido a la respectiva estructura.

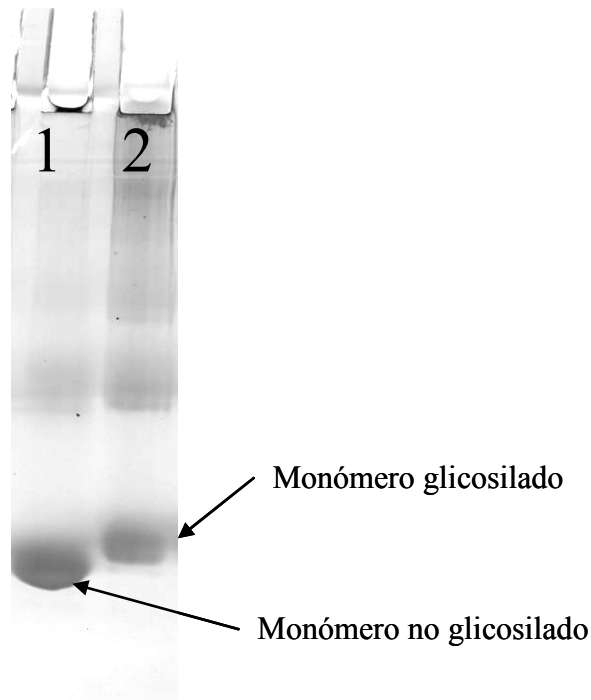


Figura 3.26: Gel electroforético de β-LG glicosilada. 1: β-LG. 2: GLI-β-LG.

3.4.3. Extensión de la glicosilación

El grado de glicosilación de la β-LG se evaluó indirectamente mediante un ensayo colorimétrico basado en la reacción entre el OPA (O-ftaldialdehído) y la amina primaria libre de la proteína. Las primeras etapas de la reacción de Maillard consisten de una condensación entre el grupo carbonilo de un hidrato de carbono con la reducción de un grupo amino, principalmente el grupo ε-amino de los residuos de lisina, para formar una base de Schiff. La secuencia de β-LG contiene 16 posibles grupos amino reactivos, incluyendo 1 α-amino y 15 ε-aminos de los residuos lisina [32]. Sólo están disponibles 12,6 grupos amino por monómero de β-LG (Tabla 3.10). Este valor coincide con lo reportado por Chevalier y col. [32] y Wooster y col. [45].

Tabla 3.10: Grupos aminos disponibles de β -LG glicosilada y/o tratada térmicamente.

Muestra	Grupos aminos detectados por molécula de β -LG	Número promedio de moléculas de glucosa unidas por molécula de β -LG
β -LG	$12,6 \pm 0,4$	0
GLI- β -LG	$3,1 \pm 0,3$	9,5
HT- β -LG	$10,6 \pm 0,5$	0
HT-GLI- β -LG	$1,9 \pm 0,2$	8,7

Para la modificación con glucosa de la proteína nativa (GLI- β -LG), el número de grupos amino disponibles se redujo a 3,1 (Tabla 3.10). Suponiendo que la glicosilación no produce cambios conformacionales en la estructura nativa de β -LG que cambian la exposición de grupos amino, el número promedio de residuos de azúcar unidos por monómero de proteína fue de 9,5. Sin embargo, según los estudios estructurales de esta Tesis, se refuerza la idea de la presencia de modificaciones introducidas por la glicosilación en la conformación de la proteína [25, 74]. A pesar de este hecho, este valor es ligeramente mayor que el reportado por Medrano y col. Estos autores determinaron el grado de glicosilación por espectrometría de masas MALDI-TOF. HT- β -LG presentó 10,6 grupos aminos disponibles por monómero de β -LG. Este valor es inferior al hallado para la β -LG nativa y posiblemente es debido a un enmascaramiento de los grupos aminos inducido por la desnaturalización y la agregación de la proteína. La muestra glicosilada y previamente tratada térmicamente (3 min a 85 °C) de la β -LG (HT-GLI- β -LG) expone sólo 1,9 grupos amino. En este caso, la diferencia entre los valores obtenidos para estas dos especies (HT- β -LG y HT-GLI- β -LG) puede atribuirse a la presencia de 8,7 residuos de azúcar unidos por monómero de la proteína glicosilada.

Por otra parte, la cantidad de grupos amino disponibles de las muestras calentadas utilizadas como control (β -LG_{control} y HT- β -LG_{control}) era aproximadamente el mismo (datos no mostrados).

3.4.4. Dicroísmo circular

Los espectros de DC UV lejano reflejan en gran medida la estructura secundaria de las proteínas. Las estructuras secundarias hoja β y hélice α muestran picos de DC por

debajo de 200 nm y mínimos en la región de 200 a 235 nm, mientras que por su parte la estructura ovillo estadístico presentan profundas depresiones cerca de los 200 nm [35]. El despliegue de la β -LG nativa promovido por el tratamiento térmico produjo un desplazamiento a longitudes de onda más cortas en el DC UV lejano. Este cambio se relaciona con la pérdida de las estructuras hoja β y hélice α con un aumento correspondiente en ovillo estadístico [21, 28]. Teniendo en cuenta estos resultados la señal a 205 nm fue elegida para monitorear los cambios en la estructura secundaria de las muestras de proteínas glicosiladas. Como se puede ver en la Figura 3.27, los efectos de la glicosilación en los espectros de DC UV lejano fueron prácticamente despreciables, lo que implica que la reacción no produjo cambios apreciables en la estructura secundaria de las muestras de β -LG nativa y HT- β -LG, respectivamente.

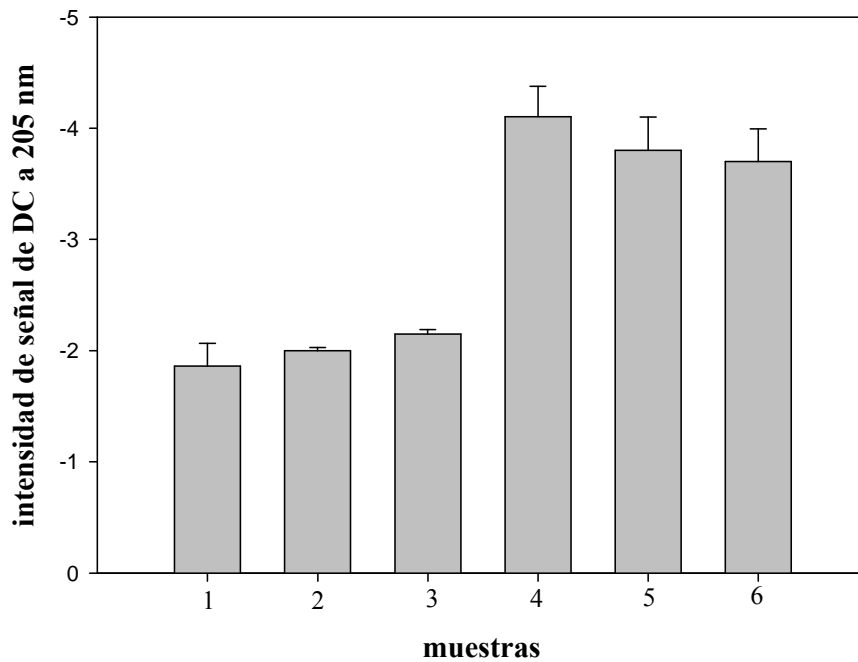


Figura 3.27: Señal de DC a 205 nm de diferentes muestras proteicas. Las barras de error fueron calculadas por la desviación estándar de tres replicados. 1 β -LG, 2 β -LG_{control}, 3 GLI- β -LG, 4 HT- β -LG, 5 HT- β -LG_{control}, 6 HT-GLI- β -LG.

El análisis de los espectros de DC en el UV cercano se utilizaron para caracterizar la estructura terciaria de las proteínas, principalmente a causa de las limitaciones de las asimetrías en el medio ambiente de los aminoácidos aromáticos [52]. Los dos picos negativos de elipticidad a 285 y 292 nm en los espectros de DC de nativa se deben principalmente a la absorbancia del Trp19 [53]. Estos dos picos negativos disminuyeron su intensidad con el tratamiento térmico de la proteína nativa, lo que

refleja cambios estructurales dentro del cáliz de la molécula de β -LG, donde se encuentra la cadena de indol del Trp19 [54]. En esta Tesis, la señal de DC a 292 nm fue seguida para medir los cambios en la estructura terciaria de proteínas promovida por la glicosilación (Figura 3.28). Aunque la diferencia entre la intensidad de la señal de DC 292 nm de β -LG, β -LG_{control} y GLI- β -LG fue estadísticamente significativa, esta diferencia fue leve. Los resultados obtenidos sugieren que la proteína nativa fue levemente desnaturalizada por la glicosilación en las condiciones ensayadas en esta Tesis. También se puede ver en la Figura 3.28 que la estructura terciaria de la β -LG fue sustancialmente más perturbada por calentamiento que mediante la adición de azúcar. Por otra parte, las diferencias entre HT- β -LG, HT- β -LG_{control} y HT-GLI- β -LG no fueron estadísticamente significativas.

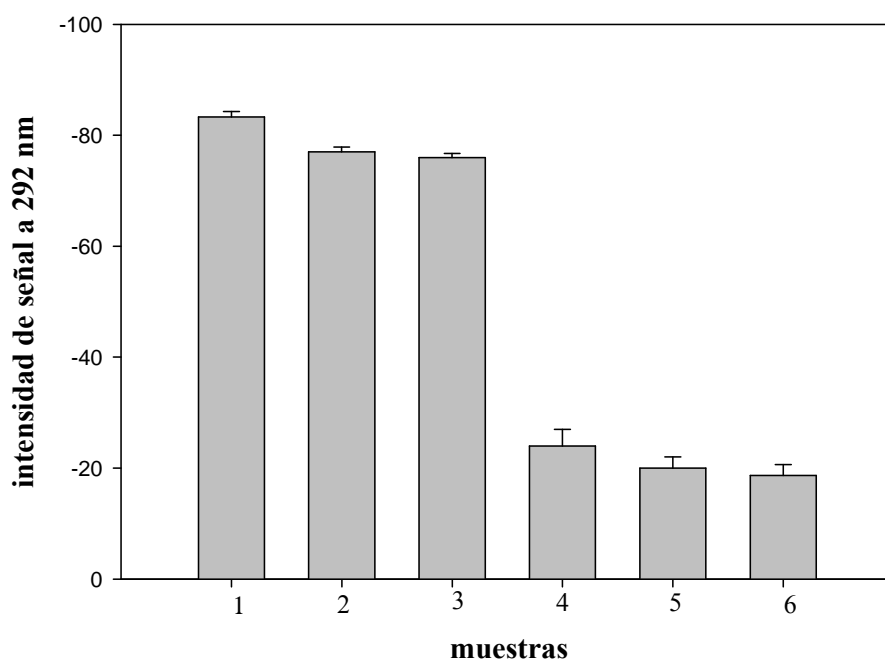


Figura 3.28: Señal de CD a 292 nm de diferentes muestras proteicas. Las barras de error fueron calculadas por la desviación estándar de tres replicados. 1 β -LG, 2 β -LG_{control}, 3 GLI- β -LG, 4 HT- β -LG, 5 HT- β -LG_{control}, 6 HT-GLI- β -LG.

3.4.5. Desnaturalización por extinción de la fluorescencia

La extinción de la fluorescencia de las proteínas por acrilamida es un método aceptado para la determinación de la hidrofobicidad superficial [56, 75]. El despliegue de la proteína provoca un desplazamiento hacia el rojo en el espectro de emisión de fluorescencia debido a la importante exposición de residuos Trp hacia el disolvente

acuoso, lo cual promueve un aumento de la extinción de la fluorescencia de las proteínas desnaturalizadas por acrilamida [55-57]. Cuanto más flexible es la estructura de la proteína y/o mayor sea la concentración de las especies desplegadas, más pronunciada es la pendiente en el gráfico de Stern-Volmer y mayor es la K_{SV} (Ecuación 3.1). Además, durante el proceso de apertura, la superficie de la proteína se hace más hidrofóbica debido a la aparición de aminoácidos apolares que previamente estaban dentro de la estructura de la proteína.

Los resultados fueron analizados a partir de la Figura 3.29. La hidrofobicidad superficial, estimada a través de los valores de K_{SV} , se incrementa con el siguiente orden: β -LG < β -LG_{control} ~ GLI- β -LG, mientras que no se observaron diferencias significativas entre HT- β -LG, HT- β -LG_{control} y HT-GLI- β -LG. Afirmando los resultados obtenidos por mediciones de DC, se puede ver en la Figura 3.29 que la modificación en la conformación de la β -LG nativa fue sustancialmente más perturbada por calentamiento que por glicosilación.

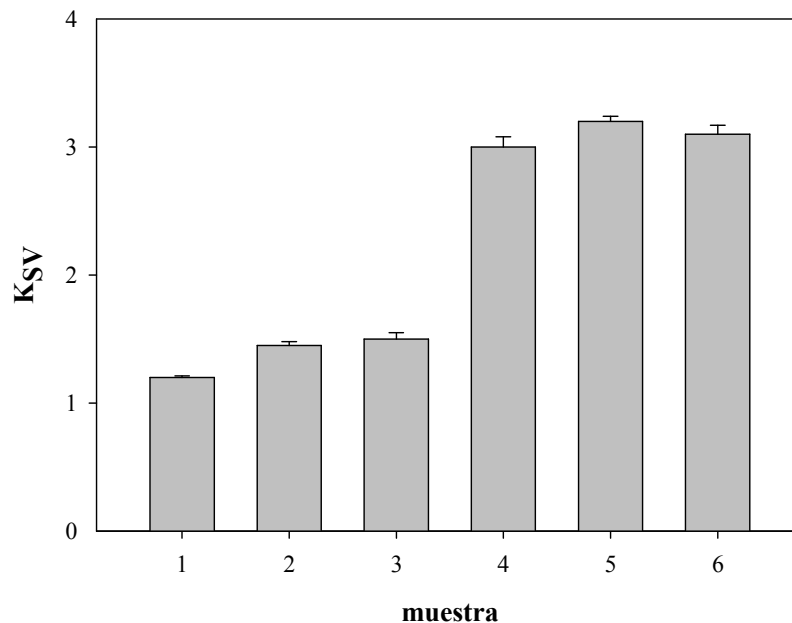


Figura 3.29: Constante de Stern-Volmer (K_{SV}) de β -LG glicosiladas y tratadas térmicamente. 1 β -LG, 2 β -LG_{control}, 3 GLI- β -LG, 4 HT- β -LG, 5 HT- β -LG_{control}, 6 HT-GLI- β -LG. Las barras de error se calcularon a partir de la desviación estándar de tres repeticiones

La mayor exposición de residuos Trp debido al desplegado parcial de la proteína posteriormente a la glicosilación también fue confirmado por el cambio del máximo de longitud de onda de emisión a valores más altos. Estos cambios se observan en los

trabajos de Corzo-Martínez y col [74] y Medrano y col. [25]. En los mencionados estudios la hidrofobicidad superficial se evaluó mediante el uso de ANS (ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico) como sonda fluorescente. Estos autores informaron que la glicosilación produjo una reducción significativa de la hidrofobicidad superficial. Medrano y col. [25] atribuyó este hecho a la agregación de proteínas. Sin embargo, Corzo-Martínez y col [74] indicaron que la disminución en la hidrofobicidad superficial de los conjugados de Maillard puede atribuirse no sólo a la formación de agregados, sino también al bloqueo de residuos de Lys por parte de la glicosilación y a que el ANS se puede unir fuertemente a grupos catiónicos de proteínas.

Por otra parte, se esperaba que la incorporación de residuos de azúcar en la cadena peptídica pudiera aumentar la hidrofiliidad superficial. En ese sentido, Corzo-Martínez y col [74], utilizando RP-HPLC llevado a cabo con una columna hidrofóbica (C4), hallaron que la β -LG glicosilada muestra un pico menos retenido que la proteína nativa.

En conclusión, los resultados presentados anteriormente son contradictorios. Por el momento no existe consenso sobre un método uniforme y absoluto para las mediciones de la hidrofobicidad. Además, la distribución y la frecuencia de aparición de sitios hidrófobos o la ubicación y distancia entre los sitios hidrófobos e hidrófilos pueden ser parámetros importantes que no están representados por el valor aritmético global de hidrofobicidad superficial.

3.4.6. Desnaturalización por espectroscopia UV

La Figura 3.30 muestra los cambios en la diferencia de absorbancia UV a 293 nm para las diferentes muestras de proteínas en función de la temperatura. El despliegue del monómero de β -LG nativo produce perfiles de desnaturalización en forma de S a temperaturas entre 60 y 90 °C, con una temperatura aparente para la desnaturalización del 50 % de la proteína cercano a los 75 °C [33]. Las medidas de $\Delta\text{Abs}_{293\text{nm}}$ se incrementan abruptamente cuando la solución se calienta por encima de 90 °C, lo que evidencia la formación de agregados de diferentes especies de la proteína [55]. La β -LG no se despliega a ovrillo estadístico antes de la agregación en la etapa final de la desnaturalización térmica [58]. A pesar de esto, el grupo oculto SH de la Cys121 se expone con el despliegue parcial de β -LG, iniciando reacciones de intercambio sulfhidrilo/disulfuro (SH/SS) que conducen a una agregación irreversible [28, 76]. Sin embargo, existen pruebas de que en esta reacción de agregación también deben

participar interacciones no covalentes [77]. Sin embargo todavía no está claro el alcance de su contribución relativa al proceso global de agregación.

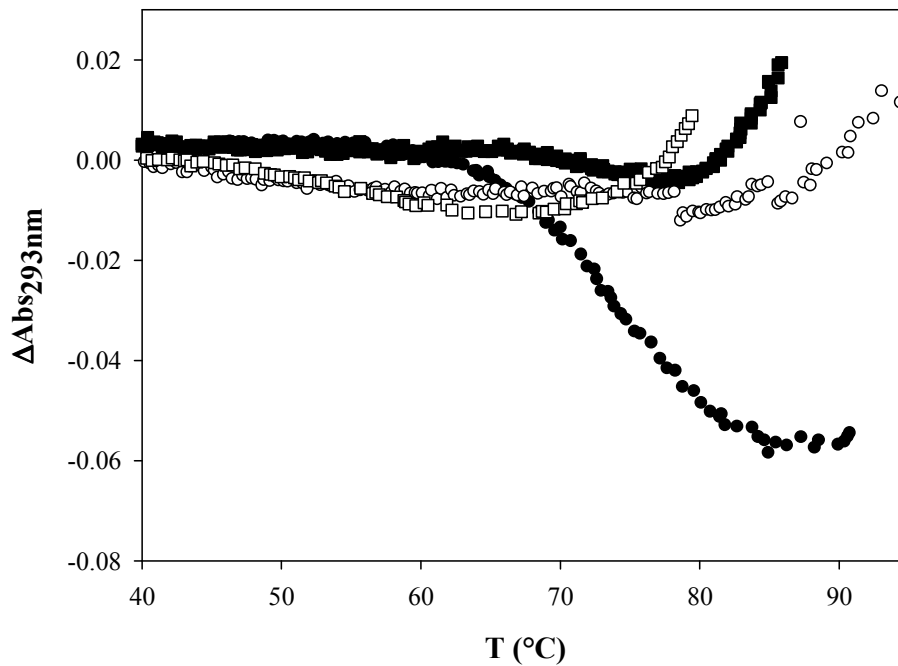


Figura 3.30: Gráficos de desnaturalización térmica seguida por diferencia de absorbancia a 293 nm de β -LG glicosilada y/o tratada térmicamente. β -LG (●), GLI- β -LG (■), HT-GLI- β -LG (○) y HT- β -LG (□)

En las mediciones de DC y extinción de la fluorescencia presentada anteriormente se evidenció pequeños cambios en la conformación nativa de β -LG producido por glicosilación. A pesar de estos resultados, la muestra GLI- β -LG presentó un comportamiento muy diferente en comparación con la β -LG nativa. También se puede ver en la Figura 3.30 que GLI- β -LG no presentó una curva con perfil en forma de S pero sí un gran incremento en ΔAbs_{293nm} cerca de los 80 $^{\circ}C$. Este hecho se puede atribuir a la agregación proteica entre las moléculas de GLI- β -LG a través de interacciones no covalentes antes que ocurra el despliegue. Esta agregación enmascara el proceso de desnaturalización que se produce antes de las reacciones de intercambio sulfhidrilo/disulfuro que conducen a una agregación irreversible. Además, la Figura 3.30 muestra que la glicosilación de HT- β -LG también acelera la agregación de proteínas.

3.4.7. Energía libre para el proceso de desnaturalización en dos estados

En la Tabla 3.11 se muestran los valores de energía libre para el proceso de desnaturalización en dos estados en ausencia de urea calculando F_{des} por medidas de extinción de la fluorescencia. Los mismos son obtenidos de la ordenada al origen del ajuste lineal de la grafica de ΔG_D en función de la concentración de urea. Para las muestras con tratamiento térmico (3 min a 85 °C) se halló un descenso de ΔG_D lo cual indica que, en ausencia de urea, el equilibrio se encuentra más desplazado hacia la forma desnaturalizada comparada con las muestras sin tratamiento térmico (GLI- β -LG, β -LG y β -LG_{control}).

Tabla 3.11: Valor de energía libre para el proceso de desnaturalización en dos estados en ausencia de urea. ΔG_D tiene unidades de kJ mol^{-1}

Muestra	β -LG	β -LG _{control}	GLI- β -LG	HT-GLI- β -LG	HT- β -LG _{control}	HT- β -LG
ΔG_D	$25,5 \pm 0,5$	$23,0 \pm 0,9$	$23,1 \pm 0,5$	$11,6 \pm 0,6$	$12,0 \pm 0,3$	$12,7 \pm 0,3$

3.4.8. Espumas

Hay dos etapas distintas en la formación de espuma por parte de una solución de proteína: (i) la eficacia en la encapsulación de gas (capacidad espumante) y (ii) el tiempo de vida de la espuma (estabilidad espumante) [46, 60].

Se sabe que la adsorción de una proteína en cantidad suficiente, dentro de la escala de tiempo de producción de espuma, es una condición para la eficaz formación de espuma (capacidad espumante) y está fuertemente correlacionada con la velocidad a la que puede reducirse la tensión superficial. Por lo tanto, uno de los factores más importantes para la formación de espuma es la velocidad de adsorción de las proteínas. La misma depende de la concentración, el peso molecular y la estructura de la proteína así como de las condiciones de la solución [79]. Por lo tanto, las proteínas desordenadas, pequeñas y flexibles son mejores agentes superficiales que las ordenadas, grandes y rígidas. La capacidad espumante también se mejora por un incremento en la hidrofobicidad superficial de la proteína [56, 60-61]. Cuanto mayor es el grado de desnaturalización que sufre una proteína mayor será su hidrofobicidad superficial. Esto conduce a una mayor afinidad de la proteína para la interfase aire/líquido, lo que permite superar la barrera contra la adsorción, lo cual se desarrolla en la interfase mientras que las proteínas están estrechamente empaquetadas [46]. Este hecho

promueve una rápida disminución de la tensión superficial y, por consiguiente, un aumento de la capacidad espumante de la proteína.

La Figura 3.31 muestra la capacidad espumante de las diferentes muestras de proteínas estudiadas medidas como la densidad de la espuma relativa (DE/DE°). Se puede observar que la capacidad espumante de la β -LG nativa fue mejorada por la glicosilación (GLI- β -LG). Aunque por medidas electroforéticas se observó que GLI- β -LG presenta un peso molecular mayor que β -LG, por medidas de DC y fluorescencia se observó un leve despliegue proteico que puede ser considerado como un factor determinante de la capacidad espumante por parte de GLI- β -LG. Sin embargo, β -LG_{control} presentó un valor más alto de densidad de espuma relativa que GLI- β -LG, lo que evidencia que el tratamiento térmico durante la glicosilación era realmente responsable de este comportamiento.

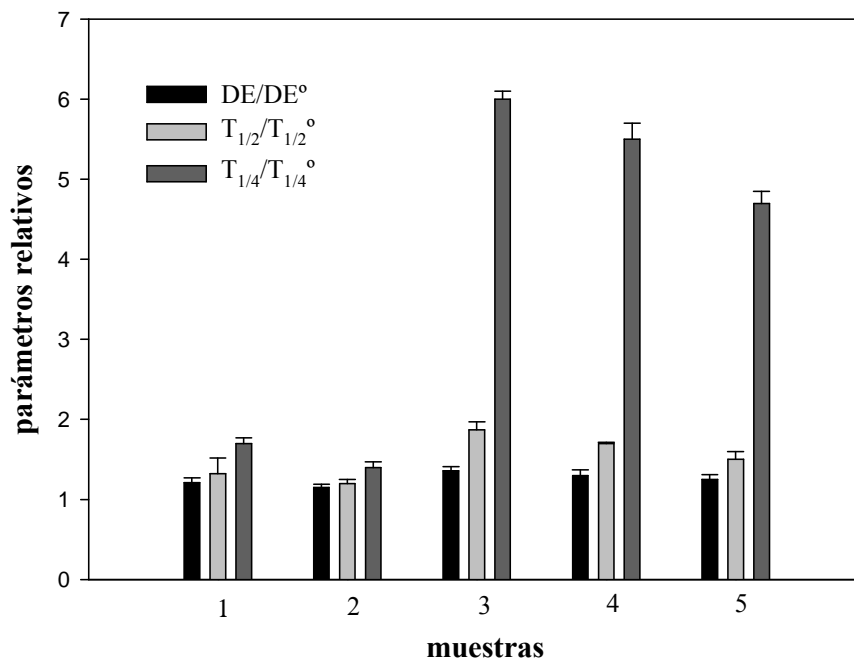


Figura 3.31: Parámetros de actividad y estabilidad espumante de la β -LG glicosilada y calentada. 1 β -LG_{control}, 2 GLI- β -LG, 3 HT- β -LG, 4 HT- β -LG_{control}, 5 HT-GLI- β -LG. DE° , $T_{1/2}^\circ$ y $T_{1/4}^\circ$ son los parámetros correspondientes a la β -LG nativa. La barra de error fue calculada de la desviación estándar de tres replicados.

La muestra HT- β -LG presenta sólo monómeros de β -LG no nativos y otras especies desnaturalizadas de mayor peso molecular [28]. En este caso, el tratamiento térmico de soluciones de β -LG produce simultáneamente dos consecuencias: (i) producción de agregados de β -LG de pesos moleculares superiores y (ii) el despliegado

por temperatura con exposición de residuos hidrofóbicos. Mientras que la presencia de agregados produce una reducción en el coeficiente de difusión, un factor desfavorable para la capacidad espumante, la exposición de residuos hidrofóbicos es un factor favorable para la capacidad espumante. En vista de los resultados obtenidos, el incremento de la hidrofobicidad superficial de HT- β -LG se convirtió en el factor más importante para la capacidad espumante [28]. La Figura 3.31 muestra que la glicosilación no introdujo ninguna modificación en la capacidad espumante de la muestra tratada térmicamente (HT-GLI- β -LG).

Por otra parte, durante la formación de espuma, las burbujas de gas están rodeadas por una película interfacial de proteínas que aseguran la protección de la espuma contra la desestabilización. Los procesos implicados en la desestabilización de la espuma son: el drenaje de líquido, la aproximación de burbuja adyacentes que conduce a la ruptura de la película (coalescencia) y de difusión de gas en la fase continua (maduración de Ostwald o desproporción) resultante en engrosamiento de las burbujas. Todos estos mecanismos se producen simultáneamente después de que se detiene el burbujeo de aire. Mientras que el drenaje y la coalescencia prevalecer al principio cuando las burbujas son principalmente esférica, de desproporción es más importante en instancias avanzadas cuando las burbujas son poliédrica. Al final, la espuma colapsa.

La estabilidad espumante para las diferentes muestras, estimada ya sea a través de $T_{1/2}/T_{1/2}^{\circ}$ o $T_{1/4}/T_{1/4}^{\circ}$, también se muestra la Figura 3.31. El aumento observado de $T_{1/2}$ en las muestras tratadas se asocia directamente con un aumento de la viscosidad de la solución de proteína debido a la presencia de agregados de β -LG desnaturalizados con altos volúmenes hidrodinámicos, lo que disminuye la velocidad de drenaje [60]. Las medidas electroforéticas realizadas en este trabajo confirman la tendencia observada.

$T_{1/4}$ para todas las muestras tratadas aumentó aún más de $T_{1/2}$ (Figura 3.31). Se puede observar en esta Figura que la estabilidad de la espuma de β -LG mejoró principalmente por el tratamiento térmico (96 h a 50 °C) más que por la glicosilación. Los mayores cambios se observaron para HT- β -LG cuya estabilidad aumento aproximadamente un 600 % respecto al valor de la proteína nativa. Este hecho es coherente con los cambios conformacionales significativos que se producen en la β -LG después de que las soluciones se calientan durante 3 min a 85 °C.

Si bien el fenómeno de drenaje estaba casi terminado, el volumen de la espuma era todavía considerable y, de acuerdo con la etapa, correspondía a una espuma

poliédrica [28]. Además, la espuma colapsó fácilmente en el caso de la β -LG nativa, mientras que una mayor estabilidad de la espuma se observó para la muestra tratada térmicamente. Estos resultados concuerdan con los alcanzados por Martin y col. [79] en la forma en que reología interfacial desempeña un importante papel contra la desproporción. Por lo tanto, los agregados formados por calentamiento de β -LG en las condiciones citadas llevaron a espumas más estabilizadas, disminuyendo la desproporción debido a la formación de películas más rígidas que resisten la compresión y pueden reducir el transporte de gas.

Croguennec y col. [58] han sugerido que la reología inicial (a corto plazo) de la película interfacial es más importante en el mecanismo general de estabilización de la espuma que la viscoelasticidad de la película interfacial que puede llegar con el envejecimiento (a largo plazo). A raíz de las conclusiones de estos autores se asumió para esta discusión que la mayor flexibilidad de las especies de β -LG (monómeros no nativos, dímeros, trímeros y oligómeros de bajo peso molecular que se presentan en soluciones de la muestra HT- β -LG) podría facilitar su reorganización en la interfase, dando lugar a rápidas asociaciones con las moléculas vecinas y así al rápido desarrollo (a corto plazo) de una película viscoelástica. Las principales fuerzas que participan en la formación de esta capa de proteínas adsorbidas estrechamente empaquetadas podrían ser puentes de hidrógeno, asociaciones hidrofóbicas e interacciones electrostáticas en lugar de enlaces disulfuro formados por reacciones de intercambio sulfhidrilo-disulfuro.

Sin embargo, la presencia de oligómeros y polímeros de alto peso molecular producen un impedimento estérico que no conduce a la formación de una capa de proteínas estrechamente empaquetadas lo que lleva a una disminución de la estabilidad espumante. La presencia de estas especies, evidenciadas por las mediciones electroforéticos, puede ser la causa de la disminución observada en la estabilidad de la espuma en HT- β -LG_{control} y GLI- β -LG.

En resumen, en las condiciones ensayadas la glicosilación mostró un efecto negativo en la estabilidad de la espuma en las muestras tratadas.

Los resultados presentados están de acuerdo con los resultados obtenidos por Chevalier y col. [32]. Sin embargo, contrariamente a las conclusiones presentadas en esta Tesis, Medrano y col. [25] observaron que la β -LG glicosilada forman espumas que mejoran la estabilidad. Además, estos autores suponen que la estabilidad de la espuma se incrementa principalmente mediante una reducción del drenaje gravitacional en lugar de una disminución de la difusión de gas o desproporción. Además de las variaciones en

los materiales y la metodología empleada la diferencia de pH usada en los ensayos puede contribuir a esta diferencia de comportamiento. Medrano y col. [25] trabajaron a pH 7,5. A este pH se produce en la molécula de β -LG la transición de Tanford. Como consecuencia de esta transición, el interior de la proteína se abre y el grupo carboxilo de Glu89 se hace accesible al disolvente.

4. Conclusiones

4.1. Tratamiento térmico de la β -LG. Cambios estructurales y propiedades espumantes

La determinación electroforética de la β -LG nativa y tratada térmicamente mostró que la mayor cantidad de dímeros y trímeros aparecen en el minuto 3 de calentamiento y que a los 10 minutos de calentamiento los oligómeros y polímeros representaban más del 60 % de las especies en solución. Todas las técnicas ensayadas prueban que 3 minutos de calentamiento a 85 °C es un momento crítico en términos de cambios conformacionales y procesos de agregación. A este tiempo la producción de monómeros no nativos es del 43 % y la de dímeros y trímeros del 36 % y 21 %, respectivamente.

Cuando se forman las espumas y son estabilizadas por la presencia de β -LG el tiempo de calentamiento previo de la proteína es una variable crucial en términos de las diferentes especies formadas. Tanto la actividad como la estabilidad espumante fueron modificadas por el tratamiento térmico.

La actividad espumante, estimada a través de la densidad de la espuma (DE), mejoró con un incremento máximo de aproximadamente un 40 % hasta los 10 minutos de calentamiento. La actividad espumante se ve reforzada por el incremento en la hidrofobicidad superficial.

La estabilidad espumante, medida a través de $T_{1/2}$ y $T_{1/4}$, y en comparación con la estabilidad de la espuma de la muestra sin calentamiento, se incrementó en grados diferentes hasta los 10 minutos de calentamiento y disminuyó alrededor de los 15 min. La mayor estabilidad podría deberse a un aumento de la viscosidad de la solución de proteínas debido a la presencia de agregados, lo que reduce la velocidad de drenado, y sobre todo debido a factores reológicos, tales como la rigidez de la película interfacial que hace a las burbujas más resistentes a la desproporción y al colapso. La mayor estabilización de la espuma se logra a los 3 minutos de tratamiento térmico, coincidiendo con los cambios conformacionales más importantes. Por otra parte, con el tratamiento térmico durante 10 minutos, la presencia de grandes agregados conduce a un efecto contrario (pérdida de la estabilidad) incluso en presencia de monómeros no nativos remanentes.

La actividad y estabilidad espumante están estrechamente vinculadas con los cambios estructurales de la proteína. El aumento de la hidrofobicidad superficial se

considera un factor decisivo en la mejora de la actividad espumante a pesar de la presencia de agregados de alto peso molecular. Además las interacciones hidrofóbicas mejoran la estabilidad de la espuma a través de la rápida formación de una película viscoelástica.

4.2. Tratamiento térmico de la β -LG y sus propiedades emulsionantes. Comparación entre las propiedades espumantes y emulsionantes

Tanto las propiedades espumantes como las emulsionantes están estrechamente relacionadas con los cambios estructurales sufridos por las proteínas. Los factores que afectan la estabilidad de las espumas y las emulsiones son similares.

Con respecto a la actividad y estabilidad emulsionante ambas están muy vinculadas, ya que una proteína de bajo poder emulsionante conduce a gotas más grandes en la emulsión y, por tanto, a una emulsión más inestable. En las condiciones ensayadas el cremado es el proceso de desestabilización más importante.

La actividad emulsionante decayó con el tiempo de calentamiento de β -LG debido a que cantidades crecientes de agregados evitan la correcta penetración de la proteína a la interfase. La estabilidad de la emulsión decayó con el tiempo de calentamiento de β -LG debido al mayor tamaño de gota generado.

Los agregados más grandes, producidos por los tiempos de calentamiento más prolongados, son arrastrados hasta la parte superior de la emulsión junto a las gotas de aceite durante el proceso de formación de crema y desempeñan un papel protector frente a la separación de fases. Estos agregados pueden ubicarse como bloques entre las gotas de aceite y construir un arreglo de múltiples capas o interactuar entre sí mismos a través de interacciones hidrofóbicas entre los residuos hidrofóbicos expuestos durante la desnaturalización térmica. Como resultado se evitan el contacto de las gotas, la coalescencia y la posterior separación de fases.

Mientras que la hidrofobicidad superficial de la β -LG fue reconocida como el principal factor que influye para mejorar la capacidad espumante, no parece ser un factor tan importante cuando se estudian emulsiones.

Las diferentes escalas de tiempo de formación, más grandes para las espumas que para emulsiones, son un factor crítico al momento de analizar el comportamiento de las propiedades funcionales en función del tratamiento térmico.

4.3. Polimerización enzimática con transglutaminasa de la β -LG. Cambios estructurales y comparación con la polimerización térmica

En esta sección se hizo una comparación de las propiedades espumantes del tratamiento con TG y térmico de la β -LG. También se realizó un estudio comparativo de las modificaciones estructurales en la β -LG por ambos tratamientos. Mientras que 3 min se señaló como el momento crítico en el tratamiento térmico, 60 min ha sido identificado como el tiempo crítico para el tratamiento con TG. En estos tiempos se verificaron los cambios conformacionales más importantes, la mayor cantidad de dímeros y trímeros, y aproximadamente la misma proporción entre las especies formadas.

Las capacidades espumantes son similares, independientemente del tratamiento, pero la estabilidad de la espuma de la β -LG calentada, medida a través del cambio en el volumen de la espuma con el tiempo, es aproximadamente 250 % superior a la misma propiedad para las proteínas tratada enzimáticamente con TG. El calentamiento produce un mayor grado de despliegue y de HS; además de estructuras menos compactas y más asimétricas, con mayor flexibilidad, lo que implica una mayor capacidad de reordenamiento en la interfase, produciendo una película viscoelástica más rígida. Esta mejora en la película puede ser la responsable de la mayor estabilidad en el volumen de la espuma.

4.4. Polimerización con transglutaminasa y posterior hidrólisis con tripsina de la β -LG. Cambios estructurales y propiedades espumantes

La polimerización enzimática con transglutaminasa y la posterior hidrólisis enzimática con tripsina a pH 8,0 produce grandes cambios en la estructura de la β -LG. Con respecto a las propiedades espumantes, el tiempo de transglutaminación no tuvo un efecto significativo sobre la actividad ni la estabilidad de la espuma formada, mientras que el posterior aumento del tiempo de hidrólisis con tripsina a pH 8,0 desfavorece significativamente la estabilidad de la espuma. Este hecho se relaciona con la hidrólisis de los agregados formados por la polimerización con TG que estabilizaban la espuma.

4.5. Glicosilación de la β -LG con glucosa y combinación con tratamiento térmico. Modificaciones estructurales y propiedades espumantes

La capacidad espumante de la β -LG nativa fue mejorada por la glicosilación (GLI- β -LG). Aunque GLI- β -LG presenta un peso molecular mayor que β -LG tiene un leve despliegue que puede ser un factor determinante de la capacidad espumante. Debido a que β -LG_{control} presentó mayor capacidad espumante que GLI- β -LG se concluye que el tratamiento térmico (96 h a 50 °C) durante la glicosilación es el responsable de este comportamiento.

El incremento de la hidrofobicidad superficial de HT- β -LG se considera el factor más importante para la capacidad espumante mientras que la glicosilación de la muestra tratada 3 min a 85°C, denominada HT-GLI- β -LG, no introdujo ninguna modificación en la capacidad espumante.

El aumento de $T_{1/2}$ en las muestras tratadas se asocia al aumento de la viscosidad de la solución de proteína debido a la presencia de agregados de β -LG desnaturalizados con altos volúmenes hidrodinámicos, lo que disminuye la velocidad de drenado.

La estabilidad de la espuma, medida a través de $T_{1/4}$, mejoró por el tratamiento térmico más que por la glicosilación. La muestra tratada térmicamente (HT- β -LG) tuvo un aumento del 600 % respecto al valor de la proteína nativa y se debe a los cambios conformacionales que se producen en la β -LG después de que las soluciones se calientan durante 3 min a 85 °C.

La mayor flexibilidad de las especies de β -LG producidas durante el tratamiento térmico (monómeros no nativos, dímeros, trímeros y oligómeros de bajo peso molecular) podría facilitar su reorganización en la interfase permitiendo asociaciones con moléculas vecinas y la rápida formación de una película viscoelástica. Las fuerzas que participan podrían ser puentes de hidrógeno, asociaciones hidrofóbicas e interacciones electrostáticas en lugar de enlaces covalentes disulfuros.

La presencia de oligómeros y polímeros de alto peso molecular, evidenciadas por las mediciones electroforéticos, pueden ser la causa de la disminución observada en la estabilidad de la espuma en HT- β -LG_{control} y GLI- β -LG.

En las condiciones ensayadas se demostró que el calentamiento de la β -LG en el tratamiento de glicosilación es el verdadero responsable de las mejoras en las propiedades espumantes, mientras que la glicosilación en si misma, tiene un efecto negativo respecto a las ventajas producidas por dicho calentamiento.

5. Resumen

La relación entre alimentación y salud se ve reflejada en la demanda de sustituir aditivos alimenticios de origen sintético por otros naturales. En este sentido, las proteínas poseen elevado potencial debido a sus propiedades nutricionales y funcionales. Estas cumplen un rol importante como surfactantes en espumas y emulsiones alimentarias. Su función está determinada por su estructura y comportamiento en la interfase. Espumas y emulsiones presentan comportamientos comunes: dos fases, requieren energía para su formación y son termodinámicamente inestables.

Los cambios estructurales de las proteínas por tratamientos físicos, químicos o biológicos pueden mejorar las propiedades funcionales que sean de utilidad tecnológica. Conocer la relación entre tratamiento, estructura y propiedad funcional es primordial para promover el uso de proteínas en nuevas formulaciones de alimentos.

La beta-lactoglobulina (β -LG) es la proteína mayoritaria del suero lácteo y es utilizada como modelo de estudio en sistemas complejos como son los concentrados o aislados de suero lácteo, ambos productos son de alto interés comercial en la región.

En este trabajo se analizaron las propiedades espumantes, emulsionantes y los cambios estructurales de la beta-lactoglobulina modificada por desnaturalización y polimerización térmica, hidrólisis y polimerización enzimática y glicosilación (reacción de Maillard).

En el tratamiento térmico de la β -LG se consideraron como factores decisivos en la mejora de la actividad y estabilidad espumante: i) al aumento de la hidrofobicidad superficial debido a la apertura proteica durante la desnaturalización y ii) a las interacciones hidrofóbicas a través de la rápida formación de una película viscoelástica, respectivamente. Con relación a las emulsiones el tratamiento térmico condujo a emulsiones menos estables. Si bien el aumento de la hidrofobicidad superficial mejoró la capacidad espumante esta no es un factor tan importante en las emulsiones.

La polimerización enzimática con transglutaminasa, comparada con el tratamiento térmico, produjo especies con menor grado de apertura, menor exposición de residuos hidrofóbicos al solvente y, como consecuencia, menor hidrofobicidad superficial. Además, promovió una estructura más compacta y simétrica que las tratadas térmicamente obteniéndose espumas menos estables.

También se estudió el efecto del tratamiento con transglutaminasa y posterior hidrólisis con tripsina de la β -LG. El tiempo de transglutaminación no tuvo un efecto significativo sobre la estabilidad espumante mientras que el tiempo de hidrólisis desfavoreció significativamente la estabilidad espumante. Este hecho se relaciona a la hidrólisis de monómeros no nativos de β -LG, dímeros y trímeros formados por la polimerización con transglutaminasa que estabilizaban la espuma.

En las condiciones ensayadas se demostró que el calentamiento de la β -LG en el tratamiento de glicosilación es el verdadero responsable de las mejoras en las propiedades espumantes, mientras que la glicosilación en si misma, tiene un efecto negativo respecto a las ventajas producidas por dicho calentamiento.

6. Bibliografía

1. Hall, G.M., *Methods of Testing Protein Functionality*. (1996), London: Blackie Academic & Professional.
2. Jeantet, R., T. Croguennec, P. Schuck, y G. Brule, Estabilización biológica y fisicoquímica. *Ciencia de los alimentos*. Vol. 1. (2010), Zaragoza: Acribia Editorial, S.A.
3. Foegeding, E.A. y J.P. Davis, Food protein functionality: A comprehensive approach. *Food Hydrocolloids*, (2011). **25**(8): p. 1853-1864.
4. Fennema, O.R., *Food Chemistry*. (1996), New York: Marcel Dekker.
5. Thompson, A., M. Boland, y H. Singh, *Milk Proteins: From Expression to Food*. (2008): Academic Press/Elsevier.
6. Delorenzi, N.J., A. Moro, P.A. Busti, G.D. Báez, y G.A. Ballerini, Effects of Structural Changes in β -Lactoglobulin on its Allergenicity, en *Whey: Types, Composition and Health Implications*, R.M. Benitez y G.M. Ortero, Editores. (2012), Nova Publishers. p. 169-182.
7. Moro, A., G. Báez, P. Busti, y N. Delorenzi. Structural analysis and functional properties of heated beta-lactoglobulin. en *Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Avances en Análisis Físicos, Químicos y Sensoriales. Trabajos completos presentados al III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. (2009). Córdoba.
8. Phillips, G.O. y P.A. Williams, *Handbook of hydrocolloids*. (2000): CRC Press.
9. Sawyer, L., P.N. Barlow, M.J. Boland, L.K. Creamer, H. Denton, P.J.B. Edwards, C. Holt, G.B. Jameson, G. Kontopidis, G.E. Norris, S. Uhrínová, y S.-Y. Wu, Milk protein structure--what can it tell the dairy industry? *International Dairy Journal*, (2002). **12**(4): p. 299-310.

10. Divsalar, A., A.A. Saboury, A.A. Moosavi-Movahedi, y H. Mansoori-Torshizi, Comparative analysis of refolding of chemically denatured [beta]-lactoglobulin types A and B using the dilution additive mode. *International Journal of Biological Macromolecules*, (2006). **38**(1): p. 9-17.
11. Ballerini, G.A., Desarrollo de un biorreactor con proteasas inmovilizadas para la hidrólisis limitada de proteínas del lactosuero y posterior análisis de las propiedades funcionales superficiales de los hidrolizados obtenidos, en *Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas*. (2011), Universidad Nacional de Rosario: Rosario.
12. Wagner, J.R., Propiedades superficiales, en *Caracterización funcional y estructural de proteínas*, A.M. Pilosof y G.B. Bartholomai, Editores. (2000), Editorial Universitaria de Buenos Aires (Eudeba). p. 41-74.
13. Belitz, H.D., W. Grosch, y P. Schieberle, *Food Chemistry*. (2009): Springer.
14. Foegeding, E.A., J.P. Davis, D. Doucet, y M.K. McGuffey, Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, (2002). **13**(5): p. 151-159.
15. Friberg, S., *Food emulsions*. (1976): M. Dekker.
16. Dergal, S.B., *Química de Los Alimentos*. (2006): Pearson Educación.
17. Moro, A., Propiedades funcionales de la principal proteína de los concentrados de proteínas del lactosuero: la beta-lactoglobulina, en *Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas*. (2008), Universidad Nacional de Rosario: Rosario.
18. McClements, D.J., *Food emulsions: principles, practice, and techniques*. (1999): CRC Press.
19. Borraccetti, M., Propiedades fisicoquímicas y estructurales de estados no nativos de k-caseína bovina y su relación con propiedades de estabilización de emulsiones, en *Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas*. (2007), Universidad Nacional de Rosario: Rosario.

20. Gauthier, S.F. y Y. Pouliot, Functional and Biological Properties of Peptides Obtained by Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins. *Journal of Dairy Science*, (2003). **86**(Supplement 1): p. E78-E87.
21. Kim, D.A., M. Corneic, y G. Narsimhan, Effect of thermal treatment on interfacial properties of [beta]-lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science*, (2005). **285**(1): p. 100-109.
22. Herceg, Z., A. Rezek, V. Lelas, G. Kresic, y M. Franetovic, Effect of carbohydrates on the emulsifying, foaming and freezing properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, (2007). **79**(1): p. 279-286.
23. Jiménez-Castaño, L., M. Villamiel, y R. López-Fandiño, Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass. *Food Hydrocolloids*, (2007). **21**(3): p. 433-443.
24. Gauche, C., J.T.C. Vieira, P.J. Ogliari, y M.T. Bordignon-Luiz, Crosslinking of milk whey proteins by transglutaminase. *Process Biochemistry*, (2008). **43**(7): p. 788-794.
25. Medrano, A., C. Abirached, L. Panizzolo, P. Moyna, y M.C. Añón, The effect of glycation on foam and structural properties of [beta]-lactoglobulin. *Food Chemistry*, (2009). **113**(1): p. 127-133.
26. Miquelim, J.N., S.C.S. Lannes, y R. Mezzenga, pH Influence on the stability of foams with protein-polysaccharide complexes at their interfaces. *Food Hydrocolloids*, (2010). **24**(4): p. 398-405.
27. Báez, G.D., A. Moro, G.A. Ballerini, P.A. Busti, y N.J. Delorenzi, Comparison between structural changes of heat-treated and transglutaminase cross-linked beta-lactoglobulin and their effects on foaming properties. *Food Hydrocolloids*, (2011). **25**(7): p. 1758-1765.

28. Moro, A., G.D. Báez, P.A. Busti, G.A. Ballerini, y N.J. Delorenzi, Effects of heat-treated [beta]-lactoglobulin and its aggregates on foaming properties. *Food Hydrocolloids*, (2011). **25**(5): p. 1009-1015.
29. Medrano, A., C. Abirached, P. Moyna, L. Panizzolo, y M.C. Añón, The effect of glycation on oil–water emulsion properties of β -lactoglobulin. *LWT - Food Science and Technology*, (2012). **45**(2): p. 253-260.
30. Galani, D. y R.K. Owusu Apenten, Heat-induced denaturation and aggregation of β -Lactoglobulin: kinetics of formation of hydrophobic and disulphide-linked aggregates. *International Journal of Food Science & Technology*, (1999). **34**(5-6): p. 467-476.
31. Liu, M. y S. Damodaran, Effect of Transglutaminase-Catalyzed Polymerization of β -Casein on Its Emulsifying Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1999). **47**(4): p. 1514-1519.
32. Chevalier, F., J.-M. Chobert, Y. Popineau, M.G. Nicolas, y T. Haertlé, Improvement of functional properties of [beta]-lactoglobulin glycated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar. *International Dairy Journal*, (2001). **11**(3): p. 145-152.
33. Busti, P., C.A. Gatti, y N.J. Delorenzi, Thermal unfolding of bovine [beta]-lactoglobulin studied by UV spectroscopy and fluorescence quenching. *Food Research International*, (2005). **38**(5): p. 543-550.
34. Genovese, M.I., F. Lajolo, y M.c. Añón, Determinación de hidrofobicidad, en *Caracterización funcional y estructural de proteínas*, A.M. Pilosof y G.B. Bartholomai, Editores. (2000), Editorial Universitaria de Buenos Aires (Eudeba). p. 169.
35. Johnson, W.C., Protein secondary structure and circular dichroism: A practical guide. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, (1990). **7**(3): p. 205-214.

36. Pearce, K.N. y J.E. Kinsella, Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1978). **26**(3): p. 716-723.
37. Villas-Boas, M.B., K.P. Vieira, G. Trevizan, R. de Lima Zollner, y F.M. Netto, The effect of transglutaminase-induced polymerization in the presence of cysteine on [beta]-lactoglobulin antigenicity. *International Dairy Journal*, (2010). **20**(6): p. 386-392.
38. Rodriguez-Nogales, J.M., Effect of preheat treatment on the transglutaminase-catalyzed cross-linking of goat milk proteins. *Process Biochemistry*, (2006). **41**(2): p. 430-437.
39. Walsh, D.J., D. Cleary, E. McCarthy, S. Murphy, y R.J. FitzGerald, Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolate following proteolysis and transglutaminase cross-linking. *Food Research International*, (2003). **36**(7): p. 677-683.
40. Rodriguez-Nogales, J.M., Enhancement of transglutaminase-induced protein cross-linking by preheat treatment of cows' milk: A statistical approach. *International Dairy Journal*, (2006). **16**(1): p. 26-32.
41. Spellman, D., E. McEvoy, G. O'Cuinn, y R.J. FitzGerald, Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, (2003). **13**(6): p. 447-453.
42. Adler-Nissen, J., Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1979). **27**(6): p. 1256-1262.
43. Laemmli, U.K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, (1970). **227**(5259): p. 680-685.

44. Townend, R., T.T. Herskovits, S.N. Timasheff, y M.J. Gorbunoff, The state of amino acid residues in [beta]-lactoglobulin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, (1969). **129**(2): p. 567-580.
45. Wooster, T.J. y M.A. Augustin, The emulsion flocculation stability of protein-carbohydrate diblock copolymers. *Journal of Colloid and Interface Science*, (2007). **313**(2): p. 665-675.
46. Wilde, P.J. y D.C. Clark, Foam formation and stability, en *Methods of testing protein functionality*, G.M. Hall, Editor. (1996), Blackie Academic and Professional. p. 110-152.
47. Baniel, Fains, y Ppopineau, Foaming Properties of Egg Albumen with a Bubbling Apparatus Compared with Whipping. *Journal of Food Science*, (1997). **62**(2): p. 377-381.
48. Tosi, E., L. Canna, H. Lucero, y E. Ré, Foaming properties of sweet whey solutions as modified by thermal treatment. *Food Chemistry*, (2007). **100**(2): p. 794-799.
49. Moro, A., G.D. Báez, G.A. Ballerini, P.A. Busti, y N.J. Delorenzi, Emulsifying and foaming properties of β -lactoglobulin modified by heat treatment. *Food Research International*, (2012)(0).
50. Bals, A. y U. Kulozik, Effect of pre-heating on the foaming properties of whey protein isolate using a membrane foaming apparatus. *International Dairy Journal*, (2003). **13**(11): p. 903-908.
51. Lee, Y.-H., Food-processing approaches to altering allergenic potential of milk-based formula. *The Journal of Pediatrics*, (1992). **121**(5, Part 2): p. S47-S50.
52. Greenfield, N.J., Methods to Estimate the Conformation of Proteins and Polypeptides from Circular Dichroism Data. *Analytical Biochemistry*, (1996). **235**(1): p. 1-10.

53. Creamer, L.K., Effect of sodium dodecyl sulfate and palmitic acid on the equilibrium unfolding of bovine beta-lactoglobulin. *Biochemistry*, (1995). **34**(21): p. 7170-6.
54. Manderson, G.A., L.K. Creamer, y M.J. Hardman, Effect of heat treatment on the circular dichroism spectra of bovine beta-lactoglobulin A, B, and C. *J Agric Food Chem*, (1999). **47**(11): p. 4557-67.
55. Busti, P., C.A. Gatti, y N.J. Delorenzi, Binding of alkylsulfonate ligands to bovine [beta]-lactoglobulin: Effects on protein thermal unfolding. *Food Research International*, (2006). **39**(4): p. 503-509.
56. Moro, A., C. Gatti, y N. Delorenzi, Hydrophobicity of Whey Protein Concentrates Measured by Fluorescence Quenching and Its Relation with Surface Functional Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2001). **49**(10): p. 4784-4789.
57. Palazolo, G., F. Rodriguez, B. Farruggia, G. Pico, y N. Delorenzi, Heat Treatment of β -Lactoglobulin: Structural Changes Studied by Partitioning and Fluorescence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2000). **48**(9): p. 3817-3822.
58. Croguennec, T., A. Renault, S. Bouhallab, y S. Pezenec, Interfacial and foaming properties of sulfhydryl-modified bovine β -lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science*, (2006). **302**(1): p. 32-39.
59. Kato, A., K. Komatsu, K. Fujimoto, y K. Kobayashi, Relationship between surface functional properties and flexibility of proteins detected by the protease susceptibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1985). **33**(5): p. 931-934.
60. Foegeding, E.A., P.J. Luck, y J.P. Davis, Factors determining the physical properties of protein foams. *Food Hydrocolloids*, (2006). **20**(2-3): p. 284-292.

61. Kato, A. y S. Nakai, Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, (1980). **624**(1): p. 13-20.
62. Villas-Boas, M.B., M.A. Fernandes, R.D.L. Zollner, y F.M. Netto, Effect of polymerization with transglutaminase on in vitro digestion and antigenicity of β -lactoglobulin. *International Dairy Journal*, (2012). **25**(2): p. 123-131.
63. Eissa, A.S. y S.A. Khan, Modulation of hydrophobic interactions in denatured whey proteins by transglutaminase enzyme. *Food Hydrocolloids*, (2006). **20**(4): p. 543-547.
64. Zhong, Q., W. Wang, Z. Hu, y S. Ikeda, Sequential preheating and transglutaminase pretreatments improve stability of whey protein isolate at pH 7.0 during thermal sterilization. *Food Hydrocolloids*, (2012)(0).
65. Sharma, R., M. Zakora, y K.B. Qvist, Susceptibility of an industrial α -lactalbumin concentrate to cross-linking by microbial transglutaminase. *International Dairy Journal*, (2002). **12**(12): p. 1005-1012.
66. Tanford, C., Protein Denaturation, en *Advances in Protein Chemistry*, J.M.L.A.J.T.E. C.B. Anfinsen y M.R. Frederic, Editores. (1968), Academic Press. p. 121-282.
67. de la Fuente, M.A., H. Singh, y Y. Hemar, Recent advances in the characterisation of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins. *Trends in Food Science & Technology*, (2002). **13**(8): p. 262-274.
68. McKenzie, H.A., G.B. Ralston, y D.C. Shaw, Location of sulfhydryl and disulfide groups in bovine β -lactoglobulins and effects of urea. *Biochemistry*, (1972). **11**(24): p. 4539-4547.
69. Croguennec, T., B.T. O'Kennedy, y R. Mehra, Heat-induced denaturation/aggregation of β -lactoglobulin A and B: kinetics of the first intermediates formed. *International Dairy Journal*, (2004). **14**(5): p. 399-409.

70. Boye, J.I., A.A. Ismail, y I. Alli, Effects of physicochemical factors on the secondary structure of β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Research*, (1996). **63**(01): p. 97-109.
71. Davis, J.P., D. Doucet, y E.A. Foegeding, Foaming and interfacial properties of hydrolyzed β -lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science*, (2005). **288**(2): p. 412-422.
72. Corzo-Martínez, M., A.C. Soria, J. Belloque, M. Villamiel, y F.J. Moreno, Effect of glycation on the gastrointestinal digestibility and immunoreactivity of bovine β -lactoglobulin. *International Dairy Journal*, (2010). **20**(11): p. 742-752.
73. Taulier, N. y T.V. Chalikian, Characterization of pH-induced transitions of β -lactoglobulin: ultrasonic, densimetric, and spectroscopic studies. *Journal of Molecular Biology*, (2001). **314**(4): p. 873-889.
74. Corzo-Martínez, M., F.J. Moreno, A. Olano, y M. Villamiel, Structural characterization of bovine beta-lactoglobulin-galactose/tagatose Maillard complexes by electrophoretic, chromatographic, and spectroscopic methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2008). **56**(11): p. 4244-4252.
75. Hiller, B. y P.C. Lorenzen, Surface hydrophobicity of physicochemically and enzymatically treated milk proteins in relation to techno-functional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2008). **56**(2): p. 461-468.
76. Hoffmann, M.A.M. y P.J.J.M. van Mil, Heat-Induced Aggregation of β -Lactoglobulin: Role of the Free Thiol Group and Disulfide Bonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1997). **45**(8): p. 2942-2948.
77. Manderson, G.A., M.J. Hardman, y L.K. Creamer, Effect of Heat Treatment on the Conformation and Aggregation of β -Lactoglobulin A, B, and C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1998). **46**(12): p. 5052-5061.

78. Rondeau, P., G. Navarra, F. Cacciabaudó, M. Leone, E. Bourdon, y V. Militello, Thermal aggregation of glycated bovine serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, (2010). **1804**(4): p. 789-798.
79. Martin, A.H., K. Grolle, M.A. Bos, M.A.C. Stuart, y T. van Vliet, Network Forming Properties of Various Proteins Adsorbed at the Air/Water Interface in Relation to Foam Stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, (2002). **254**(1): p. 175-183.