Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Impacto de la interacción entre ß-lactoglobulina, caseinoglicomacropéptido y polisacáridos en coloides alimentarios

Martínez, María Julia

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Martínez, María Julia. (2010). Impacto de la interacción entre ß-lactoglobulina, caseinoglicomacropéptido y polisacáridos en coloides alimentarios. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Martínez, María Julia. "Impacto de la interacción entre ß-lactoglobulina, caseinoglicomacropéptido y polisacáridos en coloides alimentarios". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Industrias

IMPACTO DE LA INTERACCIÓN ENTRE β-LACTOGLOBULINA, CASEINOGLICOMACROPÉPTIDO Y POLISACÁRIDOS EN COLOIDES ALIMENTARIOS

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Industrial

Lic. María Julia Martinez

Director de tesis: Dra. Ana M. R. Pilosof

Buenos Aires, 2010.

Impacto de la interacción entre β-lactoglobulina, caseinoglicomacropéptido y polisacáridos en coloides alimentarios.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue estudiar el impacto de las interacciones entre β–lg y CMP y entre ellos y polisacáridos en coloides alimentarios. Previamente se caracterizó el comportamiento de los componentes solos. El CMP presentó autoensamblaje reversible dependiente del pH a temperatura ambiente. A pesar de que a pH 7 el CMP no gelifica, todos los sistemas mixtos gelificaron indicando un efecto sinérgico. Por el contrario, a pH 3,5 donde ambos componentes gelificaron por sí solos, se observó un fuerte antagonismo. Este comportamiento fue atribuido a la formación de estructuras CMP:β–lg asociadas electrostáticamente. La agregación y gelificación térmica de la β–lg es promovida y acelerada en presencia de polisacáridos. Esto se puede explicar en términos de un aumento de la concentración efectiva de β–lg debido a la limitada compatibilidad termodinámica entre ambos biopolímeros. Respecto al comportamiento interfacial de mezclas CMP:polisacáridos predominó el efecto competitivo ya que el CMP es muy pequeño y no se favorecerían tanto los fenómenos segregativos. Los resultados de este trabajo indican que la asociación entre CMP y β–lg en solución es más una regla que una excepción y tiene un fuerte impacto sobre las propiedades funcionales. Probablemente debido a que la β–lg domina el comportamiento de los sistemas mixtos CMP:β–lg, no se ha dado importancia al estudio de la influencia de CMP en productos derivados del suero. Los resultados muestran que el sinergismo entre CMP y β–lg en ciertas condiciones puede ser explotado para el diseño de alimentos con una textura deseada conteniendo CMP como ingrediente bioactivo. También se demuestra que la utilización de mezclas de proteínas y polisacáridos puede promover una mejora de las propiedades funcionales.

Palabras claves: β–lactoglobulina, caseinoglicomacropéptido, polisacáridos, interacciones, geles, interfases.

Impact of the interaction between β-lactoglobulin, casein glycomacropeptide and polysaccharides in food colloids.

Abstract

The objective of this work was to study the impact of the interactions between CMP–β–lg and with polysaccharides in food colloids. Previously the behaviour of the pure components was characterized. CMP undergoes a pH-dependent self-assembly at room temperature. At pH 7.0, where CMP did not gel, all the mixed systems gelled, but strong synergism was observed for 25:75 CMP:β–lg ratio. Contrarily, at pH 3.5 where both components gelled on their own, a strong antagonism was observed. This behaviour is ascribed to the formation of electrostatically driven assembled CMP:β–lg structures. The thermal aggregation and gelation of β–lg is promoted and accelerated in the presence of polysaccharides. This was explained in terms of an increase of the effective β–lg concentration because of a limited thermodynamic compatibility between both biopolymers. Respect to the interfacial behaviour of CMP:polysaccharides mixtures predominated the competitive effect due to CMP is very small so segregative phenomenon are not favorable. The present results point out that the assembly of CMP and β-lg in aqueous solutions is more a rule than an exception and has a strong impact on functional properties. Probably, because β-lg dominates the behaviour of mixed CMP:β-lg systems it has been not highlighted the importance of studying the influence of CMP in whey products. The results show that the synergism between CMP and β-lg in some conditions can be exploited for the design of foods with desired textures containing CMP as a bioactive ingredient. Additionally, it was demonstrated that the use of protein and polysaccharides mixtures can promote an improvement on functional properties.

Keywords: β–lactoglobulin, casein glycomacropeptide, polysaccharides, interactions, gels, interfaces.

Agradecimientos.

A la Dra. Ana Pilosof por su presencia constante, por ser una gran guía durante todo el trabajo de investigación y el proceso de escritura, por sus importantes aportes, comentarios y sugerencias. Y sobre todo por demostrarme su confianza, por ayudarme en muchos momentos en que necesite un buen consejo y por enseñarme a investigar.

A mis padres, por su apoyo incondicional en todos los aspectos de la vida, por su formación, por su cariño y en particular por su gran ayuda para llevar a cabo este trabajo de tesis. A Clau, Osw y Santi con quienes, pese a la distancia, compartimos muchos momentos aunque sea cámara de por medio. A toda mi familia, primos, tios y sobris que me han apoyado en la realización de este trabajo.

A Vic, por su inmensa ayuda y paciencia en la realización y escritura de este trabajo, por los valiosos aportes brindados durante mi estancia en Sevilla y, sobre todo, por hacerme comenzar y terminar cada día con una sonrisa.

A mis compañeros de grupo de trabajo, los que están y los que estuvieron, por la colaboración de cada uno de ellos en la realización de este trabajo. A Oscar por orientarme en muchísimas cuestiones profesionales y personales, por la ayuda en las mediciones de DSC y por su amistad, a Kari por su ayuda con muchas electroforesis, a Edith por todos los trabajos compartidos en los cuales aprendí mucho y por su excelente compañerismo, a Fede y Mariana por su linda amistad, a Rosa, Nerina, Rosita, Dina, Paula, Caro, Laura, Bruna y más personas que pasaron por el laboratorio y con quienes compartí lindos momentos.

A mis amigos de Bolívar, de Balcarce y de todos lados, que durante todo este tiempo me hicieron sentir que la distancia, poca o mucha, no es obstáculo para seguir sintiéndolos cerca. En especial a Pao, con quien aprendí a vivir y disfrutar Buenos Aires y que me aguantó y escuchó durante muchos momentos, lindos y difíciles, en el transcurso de esta tesis.

A todos los integrantes del grupo de Pilar con quienes compartimos muy lindos momentos en cumpleaños, despedidas y congresos.

Al Dr. Juan Miguel Rodríguez Patino, por brindarme la posibilidad de realizar mis estudios de interfase en su laboratorio y por la orientación brindada para realizarlos.

Al Dr. Cecilio Carrera Sánchez por su gran ayuda en el uso de los equipos y en la realización de mi trabajo experimental en mi estancia en Sevilla y por su linda amistad.

A todo el grupo de gente de Sevilla, Vic, Charly, Juan Carlos, Moraguín, Nuri, Paco Toscano, Paco Carrillo, Nieves, José Fernando, Mari Carmen, María Luisa, Felipe, Padi que me hicieron sentir como una más del grupo desde el primer día. Y a Charo por hacerme sentir como en mi casa.

A la M.Sc. Liliana Santiago, por permitirme realizar las mediciones de hidrofobicidad en el Instituto de Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional del Litoral en Santa Fe y al Dr. Carlos Carrara y a Laura por haberme recibido cordialmente en su laboratorio y ayudarme en las mediciones realizada allí.

A todos los docentes del Departamento de Industrias que han participado en mi formación académica durante el doctorado y a través de la docencia que realizo.

A la Universidad de Buenos Aires, por haberme otorgado la beca para la realización de este trabajo y porque junto con la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica han otorgado el financiamiento necesario para el trabajo de investigación.

Al Programa CYTED por haber financiado mi estancia en la Universidad de Sevilla.

A todos los integrantes del Departamento de Industrias, becarios, docentes y no docentes con quienes compartí estos años de doctorado y que colaboraron de diferentes maneras en mis tareas de investigación y docencia.

A todos, sinceramente ¡¡muchas gracias!!

"La paz comienza con una sonrisa"

Beata Madre Teresa de Calcuta.

A mis padres y a Vic.

ÍNDICE

Introducción…….. 1

1. Proteínas……. 3

1.1. Propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas……. 3

1.2. Proteínas del suero……... 4

1.2.1. Producción mundial…….. 5

1.2.2. Producción en Argentina…….. 5

1.2.3. Propiedades funcionales de proteínas lácteas……9

1.2.4. β–lactoglobulina…… 12

1.2.4.1. Propiedades biológicas de la β–lg…….. 14

1.2.4.2. Propiedades funcionales de la β–lg…… 15

1.2.5. Caseinoglicomacropéptido…… 15

1.2.5.1. Actividades biológicas del CMP…… 18

1.2.5.2. Propiedades funcionales del CMP……. 18

2. Polisacáridos……19

2.1. Alginatos…….. 19

2.2. Carragenanos…… 23

2.3. Goma Xántica…….. 26

3. Interacciones entre biopolímeros…….27

3.1. Interacción proteína–proteína……...29

3.1.1. Fuerzas de interacción…….. 29

3.1.2. Ensamblado de proteínas nativas…….. 32

3.1.3. Interacciones proteína–proteína causadas por procesamiento…….. 33

3.1.3.1. Interacciones inducidas por calor……... 33

3.1.3.2. Efecto de las interacciones proteína–proteína en la gelificación inducida por calor…… 35

3.1.3.3. Efecto de las interacciones proteína–proteína en las interfases…. 35

3.2. Interacción proteína–polisacárido…… 35

3.3. Técnicas para la caracterización de las interacciones proteína–proteína o proteína–polisacárido en solución…….. 42

4. Coloides alimentarios…….. 44
4.1. Gelificación…….. 45
4.1.1. Técnicas de gelificación…… 45
4.1.2. Gelificación por calor de proteínas globulares……. 46
4.1.3. Caracterización del proceso de gelificación……. 50
4.2. Interfases…….. 50
4.2.1. Sustancias tensioactivas…… 50
4.2.2. Concepto de tensión superficial/interfacial……... 51
4.2.3. Cinética de adsorción en la interfase……52
4.2.4. Adsorción competitiva en mezclas de diferentes moléculas tensioactivas…….. 58
4.2.5. Propiedades reológicas de las películas proteicas……. 60
4.2.6. Técnicas para el estudio de las propiedades interfaciales……. 62
5. Referencias…….. 63

Objetivos…….81
Objetivo general……... 83
Objetivos específicos……83

Materiales y métodos…….85
1. Materiales……..... 87
2. Métodos.……..... 89
2.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)…….. 89
2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)…….. 90
2.3. Medición de tamaño de partícula…… 91
2.4. Test de inclinación o “tilting test”…… 94
2.5. Reología dinámica…… 95
2.6. Caracterización de la separación de fases…… 97
2.7. Determinación de la concentración de proteínas…… 98
2.8. Hidrofobicidad superficial……98
2.9. Determinación de las propiedades interfaciales……... 99
2.9.1. Determinación de la tensión superficial…… 99

2.9.2. Determinación de las propiedades reológicas de las películas superficiales…….. 111
3. Referencias…….. 114

Resultados…….. 119

Sección I – Interacciones entre β–lg y CMP……123
Objetivo…… 125
¿Por qué es importante estudiar las interacciones de los sistemas mixtos CMP:β–lg?..... 125

Capítulo 1 – Interacciones entre β–lg y CMP en solución acuosa……127
I.1. Interacciones entre β–lg y CMP en solución..... 129
I.1.1. Caracterización de la asociación/agregación de β–lg por DLS..... 129
I.1.1.1. Efecto de la concentración sobre el estado de asociación de β–lg..... 129
I.1.1.2. Efecto del tratamiento térmico en la agregación de β–lg…… 133
I.1.1.3. Efecto del pH sobre el estado de asociación de β–lg…….. 143
I.1.2. Asociación/autoensamblaje del CMP dependiente del pH…… 158
I.1.2.1. Perfil electroforético del CMP…….158
I.1.2.2. Estado de asociación del CMP en función del pH…….. 160
I.1.2.3. Autoensamblaje del CMP en el tiempo…….. 165
I.1.2.4. Evaluación de la reversibilidad por pH del autoensamblaje del CMP……... 168
I.1.2.5. Modelo del autoensamblaje del CMP……...171
I.1.2.6. Efecto del tratamiento térmico en el autoensamblaje del CMP……..... 175
I.1.3. Caracterización de sistemas mixtos CMP:β–lg a pH 7 y 3,5…….184
I.1.3.1. Tamaño promedio y distribución de tamaño de partícula a temperatura ambiente en soluciones mixtas a pH 7……. 184
I.1.3.2. Transiciones térmicas de los sistemas mixtos CMP:β–lg a pH 7 estudiadas por calorimetría diferencial de barrido (DSC)……187

I.1.3.3. Electroforesis de sistemas mixtos a pH 7…… 189
I.1.3.4. Efecto del tratamiento térmico en sistemas mixtos CMP:β–lg a pH 7…….. 190
I.1.3.5. Tamaño promedio y distribución de tamaño de partícula a temperatura ambiente en soluciones mixtas a pH 3,5……. 195
I.1.3.6. Transiciones térmicas de los sistemas mixtos CMP:β–lg a pH 3,5…….. 197
I.1.3.7. Efecto del tratamiento térmico en sistemas mixtos CMP:β–lg a pH 3,5…….. 198
I.1.4. Referencias…… 203

Capítulo 2 – Interacciones entre β–lg y CMP en geles…….. 211
I.2. Interacciones CMP–β–lg en geles……..213
I.2.1. Efecto del pH sobre la gelificación inducida por calor de soluciones de β–lg…….213
I.2.2. Gelificación de CMP……225
I.2.3. Gelificación de los sistemas mixtos CMP:β–lg…… 227
I.2.4. Referencias…… 238

Capítulo 3 – Interacciones entre β–lg y CMP en interfases……..… 243
I.3. Interacciones CMP–β–lg en interfases…….. 245
I.3.1. Comportamiento interfacial de CMP a diferentes pH…….. 245
I.3.1.1. Tamaño promedio y distribución de tamaño de partícula de CMP en soluciones acuosas……245
I.3.1.2. Isoterma de adsorción del CMP en la interfase aire–agua……. 248
I.3.1.3. Dinámica de adsorción…… 252
I.3.1.4. Propiedades viscoelásticas de películas de CMP…… 258
I.3.2. Interacciones y comportamiento interfacial en mezclas de β–lg y CMP……264
I.3.2.1. Tamaño promedio y distribución de tamaño de partícula en soluciones acuosas…….. 264
I.3.2.2. Hidrofobicidad superficial……...267

I.3.2.3. Propiedades interfaciales de sistemas mixtos CMP:β–lg…… 268
Isoterma de adsorción de los sistemas mixtos CMP:β–lg……268
Cinética de adsorción……...269
Reología interfacial de los sistemas CMP:β–lg…….. 271
I.3.3. Referencias……...……. 276

Sección II – Interacciones entre proteínas lácteas y polisacáridos……... 281
Objetivo……... 283
¿Por qué es importante estudiar las interacciones de los sistemas mixtos CMP o β–lg y polisacáridos?..... 283

Capítulo 1 – Interacciones entre proteínas lácteas y polisacáridos en solución acuosa……..… 285
II.1. Interacción proteína–polisacárido en solución..... 287
II.1.1. Asociación/agregación de β–lg inducida por la presencia de polisacáridos a pH 7..... 287
II.1.1.1. Efecto de la adición de polisacáridos a temperatura ambiente…….. 287
II.1.1.2. Agregación inducida por calor de mezclas de β–lg:KO…… 294
II.1.2. Referencias..... 300

Capítulo 2 – Interacciones entre proteínas lácteas y polisacáridos en geles…… 303
I.2. Interacciones proteína–polisacárido en geles..... 305
II.2.1. Gelificación de sistemas mixtos β–lg:PGA a pH 7……. 305
II.2.2. Referencias…….. 314

Capítulo 3 – Interacciones entre proteínas lácteas y polisacáridos en interfases…… 317
II.3. Propiedades interfaciales de polisacáridos y sus mezclas con CMP…… 319
II.3.1. Isotermas de adsorción……319
II.3.1.1. Isoterma de adsorción de KO en la interfase aire–agua……319
II.3.1.2. Isoterma de adsorción de mezclas CMP–polisacáridos……. 321
II.3.2. Cinética de adsorción……... 326

II.3.3. Reología interfacial de KO y sus mezclas con CMP…….. 332
II.3.4. Referencias..... 335

Conclusiones generales……..339

Introducción

La β–lactoglobulina (β–lg) es la proteína mayoritaria del suero lácteo y posee muy buenas propiedades funcionales, razón por la cual es un producto con gran potencial para la formulación de alimentos.

El caseinoglicomacropéptido (CMP), en cambio, a pesar de que su presencia en el suero lácteo también es muy significativa, su impacto no ha sido tenido en cuenta por lo general al estudiar las propiedades funcionales de los concentrados y aislados de proteínas del suero. Por ello, y porque este péptido presenta además una importante actividad biológica que ha sido estudiada en los últimos años, se estudió el CMP y su comportamiento en combinación con la β–lg y los polisacáridos a fin de estudiar las propiedades funcionales que presentan los sistemas mixtos.

Además, es importante resaltar que la β–lg y el CMP son provenientes de un producto (el suero lácteo) que durante muchos años fue considerado un desecho en el proceso de elaboración de queso. Por eso, el aprovechamiento de este producto de alto valor nutricional y su utilización en la formulación de nuevos alimentos es un desafío que vale la pena enfrentar.

La elección de los polisacáridos estuvo basada en su amplia aplicación en diferentes condiciones y en las notables mejoras que imparten sobre los productos debido a las propiedades funcionales que presentan. Además, al mezclarlos con proteínas del suero, los polisacáridos aportan a los sistemas mixtos características sensoriales agradables para el consumidor que suelen ser deficientes en dichos sistemas proteicos.

En las páginas siguientes se explicarán las características fisicoquímicas y las propiedades funcionales de las proteínas y los polisacáridos utilizados en este trabajo para contar con ellas como herramientas para el análisis de los resultados obtenidos y además se describirán los coloides donde se evaluarán estos biopolímeros.

1. Proteínas.

1.1. Propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas.

Las funciones típicas de las proteínas en los alimentos incluyen la gelificación, emulsificación, espumado, textura, absorción de agua, adhesión y cohesión, y absorción y retención de lípidos y flavour.

Las propiedades funcionales están relacionadas con las propiedades físicas, químicas y estructurales intrínsecas de las proteínas, incluyendo tamaño, forma, composición y secuencia de aminoácidos, carga neta y distribución de las cargas y relación hidrofobicidad/hidrofilicidad *(Damodaran, 1996)*. Particularmente están definidas por la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, las uniones inter e intramoleculares, principalmente uniones disulfuro, la rigidez/flexibilidad molecular en respuesta a los cambios de las condiciones ambientales y la naturaleza y la extensión de las interacciones con otros componentes.

Kinsella (1976; 1982) definió a las propiedades funcionales como "aquellas propiedades físicas y químicas que afectan el comportamiento de las proteínas en los sistemas alimentarios durante el procesamiento, el almacenamiento, la preparación y el consumo".

El entendimiento de las propiedades físicas, químicas y funcionales de las proteínas y los cambios que sufren estas proteínas durante el procesamiento es esencial para comprender el comportamiento de las proteínas en los alimentos *(Damodaran, 1997)*.

1.2. Proteínas del suero.

Aunque se desconoce el verdadero origen del queso, su existencia se remonta a tiempos muy antiguos. Paralelamente, el aprovechamiento (aunque parcial) del suero tendría la misma antigüedad. Se sabe que 500 años a.C., los griegos ya prescribían el suero como bebida terapéutica. Históricamente fue utilizado por médicos de gran renombre como Hipócrates, Galeno, Avicena, etc, que recomendaban toma regular de suero por sus efectos depurativos y desintoxicantes del organismo y también fue utilizado como brebaje contra quemaduras y diversas enfermedades. Incluso en el Siglo XVIII, se abrieron sanatorios especializados en las "curas de suero de queso".

El suero de queso es un residuo líquido rico en proteínas (6 g de proteína/litro de suero) que tanto en la Argentina, como en el resto del mundo, todavía no se aprovecha en forma eficiente. Debido a que es un contaminante ambiental, es de gran interés transformar este residuo en un producto de alto valor agregado.

1.2.1. Producción mundial.

La producción mundial de suero líquido se estima en 118 millones de toneladas, lo que sería equivalente a 7 millones de toneladas de suero en polvo, pero dado que la producción mundial de este suero es de 4,3 millones de toneladas, las cifras indican que resta un 38 % de suero que se encuentra disponible para su aprovechamiento o que forma parte de los vertidos industriales *(Martin Diana, 2001)*.

1.2.2. Producción en Argentina.

Dado que el suero líquido proviene mayoritariamente de la elaboración de quesos, éste adquiere gran importancia en países como el nuestro, con una arraigada tradición quesera y niveles de producción significativos.

En este marco, resulta interesante conocer, al menos de modo orientativo, el orden del volumen total de sueros de lechería, la producción potencial de suero en polvo y su comparación con las estadísticas oficiales de elaboración real del producto en Argentina.

En 2008 se procesaron en Argentina con destino a quesos en el orden de 4200 millones de litros de leche, los que habrían generado unos 3800 millones de litros de suero (se generan 91 litros suero por cada 100 litros de leche cruda). Si todo este volumen de suero se secara en plantas industriales, y utilizando una conversión de 22 litros de suero líquido por cada kilo de suero en polvo, el país podría producir alrededor de 170000 toneladas de suero en polvo *(Schaller, 2009)*.

En términos teóricos, si se compara esta producción potencial con la elaboración efectiva de suero en polvo se podrá tener una noción aproximada del porcentaje de utilización.

En 2008 se elaboró entre 32 y 36 mil toneladas de suero en polvo y otros productos similares. A grandes rasgos, esto significa que en el país se seca entre el 20 y el 25 % del potencial de suero disponible. Como dato de referencia puede consignarse que, por ejemplo, usando datos oficiales de 1991, una estimación similar arroja un aprovechamiento inferior al 3 % *(Schaller, 2009)*.

Estas cifras, aunque aproximadas, permiten extraer dos conclusiones: por un lado, que se ha avanzado mucho en la búsqueda de nuevas alternativas de aprovechamiento de los sueros y en consecuencia en el cuidado del medio ambiente; pero a la vez llama la atención sobre el

enorme compromiso que representa seguir explorando y explotando este recurso proteico con gran potencial de desarrollo de cara a la demanda del futuro cercano.
Las estadísticas oficiales muestran un crecimiento explosivo en la producción de suero en polvo en el último tiempo. En efecto, la producción nacional se duplicó entre 2004 y 2007, y habría alcanzado un nuevo récord en 2008 *(Schaller, 2009)*.

En otro orden, se estima que en Argentina existen aproximadamente doce importantes plantas procesadoras de sueros de lechería, la mayor parte localizadas en la zona pampeana. Las dos firmas más importantes por su capacidad de procesamiento son AFISA (Arla Food Ingredients SA, un joint venture al 50 % de la danesa Arla con la argentina Sancor), con una planta en la localidad cordobesa de Porteña; y Remotti, con plantas en Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires. Otras son: Mastellone Hnos., Milkaut, García Hnos., Sobrero y Cagnolo, Cotapa, Arcolen, Williner, Saputo, Cooperativa de James Craik y Lácteos Conosur.
Las compañías líderes utilizan tecnología de punta y cumplen los más exigentes estándares internacionales, accediendo incluso a certificaciones BPM e ISO.

El gran crecimiento de la producción nacional vino de la mano de un fuerte impulso de las colocaciones externas. Entre 1999 y 2008 las exportaciones se multiplicaron por once, hasta alcanzar según se estima, un récord del orden de las 36000 toneladas y U$S 86 millones en 2008. El 84 % del volumen colocado corresponde al lactosuero y el resto a otros componentes naturales de la leche. El precio promedio para 2008 fue de unos 1600 U$S/tonelada para el suero en polvo y aproximadamente 6500 U$S/tonelada para los distintos concentrados de proteína *(Schaller, 2009)*. Ambos grupos de productos se comercializan con 30 a 40 países de todo el mundo. Brasil, Indonesia, China, Chile y Singapur dan cuenta del 71 % del volumen.

En resumen, queda claro que el proceso de valorización de los sueros de lechería se encuentra en pleno auge y que, a pesar de la crisis de los mercados mundiales que existe en este último año, la senda de permanente innovación en tecnología de procesos y productos seguirá siendo transitada por aquellas industrias líderes que además de buscar la mejora de la eficiencia y una mayor rentabilidad, generan divisas genuinas a través de la exportación de productos de alto valor agregado, a la vez que dan cumplimiento a las normativas ambientales.

Durante muchos años, la forma más común de desechar el suero ha sido sencillamente verterlo en los cursos de agua, lo que es muy perjudicial desde el punto de vista ambiental. De hecho, se puede estimar que una fábrica de queso que procesa 280000 litros de leche cruda por día, por ejemplo, produce alrededor de 250000 litros de suero líquido y puede contaminar tanta agua como una ciudad de 50000 habitantes *(FAO, 1997)*. Una práctica menos perjudicial ha sido y es de uso muy frecuente: el suministro de suero a los terneros o cerdos como complemento de su alimentación.

En la **Tabla 1** se presenta la composición proteica de la leche bovina observándose que las caseínas son las proteínas más abundantes (80 % del total). Las caseínas de la leche tienen pesos moleculares que oscilan entre 25000 y 40000 Da; las más importantes son la α, β y κ, que representan, respectivamente, el 50, 30 y 15 % del total de las caseínas. En la leche, estas proteínas se asocian entre sí para formar partículas denominadas micelas, que se encuentran estabilizadas gracias a la presencia de la κ–caseína *(Grasselli, Navarro del Cañizo, Fernández Lahore, Miranda, Camperi & Cascone, 1997)*.

Tabla 1. Composición proteica de la leche de vaca.

PROTEÍNA	LECHE DE VACA (g/100 ml)
Caseína	2,8
α–lactalbúmina	0,12
β–lactoglobulina	0,3
Inmunoglobulinas	0,05
Lactoferrina	0,02
Lactoperoxidasa	0,003
Totales	**3,4**

Fuente: *Grasselli et al. (1997)*.

El tipo de suero y su composición (**Tabla 2**) dependen del método utilizado durante la remoción de la caseína: (i) "suero de queso", es un co–producto obtenido durante la elaboración del queso, proceso en la cual se agregan enzimas coagulantes a la leche, que catalizan la ruptura de un enlace peptídico de la κ–caseína: la unión entre el aminoácido fenilalanina en la posición 105 y la metionina en la 106. Este clivaje de la κ–caseína provoca la desestabilización de las micelas y por lo tanto la precipitación de casi todas las caseínas, las que posteriormente se van a transformar en queso; (ii) "suero ácido", obtenido después de la

acidificación directa o indirecta de la leche para la preparación de caseína ácida y queso cottage.

La mayoría del suero producido mundialmente es el suero de queso o también llamado "suero dulce". Se calcula que aproximadamente el 94 % del suero producido en Estados Unidos es suero dulce y el restante 6 % es suero ácido *(Anónimo, 2002)*.

Durante el clivaje de la κ–caseína en el proceso de elaboración del queso se forman además diferentes péptidos, entre ellos el caseinoglicomacropéptido (CMP) que no se encuentra naturalmente en la leche pero sí en el suero de queso (**Tabla 2**).

Tabla 2. Composición proteica del suero de queso y suero ácido.

	COMPOSICIÓN PROMEDIO (g/l)	
	SUERO DE QUESO	**SUERO ÁCIDO**
β–lactoglobulina	3,5	3,5
α–lactalbúmina	1,3	1,3
Sero albúmina	0,1	0,1
Inmunoglobulinas	0,4	0,4
Lipoproteínas	0,2	–
Proteosa–peptona	0,2	0,2
Caseinoglicomacropéptido	1	–
Proteína de suero total	6,7	5,8

Fuente: *Oakenfull, Pearce & Burley (1997)*.

En nuestro país el suero de queso se utiliza para preparar ricota, precipitando las proteínas por calentamiento en medio ácido. En este procedimiento se aprovechan solamente las propiedades nutricionales de las proteínas, ya que el procedimiento las desnaturaliza, es decir que las proteínas se despliegan, pierden su estructura y por lo tanto también muchas de sus propiedades funcionales *(Grasselli et al., 1997)*.

Las posibilidades tecnológicas para el aprovechamiento del suero líquido como materia prima son amplísimas. La más usual es la deshidratación, por spray, para obtener suero en polvo o concentrados de proteína de suero (WPC por sus siglas en inglés, "whey protein concentrates"). En el primer caso el suero es deshidratado directamente, mientras que en el segundo el suero es previamente enriquecido en proteína, eliminando sales y lactosa mediante tecnología de membrana.

No hay dudas de que este proceso de continua valorización del suero líquido ha sido posible gracias a la evolución permanente de la aplicación de las tecnologías de membranas en la industria láctea. El gran avance de esta rama de la ingeniería se produjo a comienzos de la década del setenta cuando se desarrolló la tecnología de ultrafiltración. La ultrafiltración se caracteriza por poseer un espectro de corte que va de 3000 a 100000 kDa. El corte más común para sistemas de lechería es 10000 kDa. Éste es el tamaño de poro tradicional para separar las proteínas del suero de la lactosa, para producir WPC desde 35 a 85 % de pureza. Durante el proceso de ultrafiltración las proteínas del suero no se desnaturalizan, por lo que sus propiedades funcionales permanecen intactas.

El paso más reciente en esta notable evolución fue la nanofiltración, que comenzó a aplicarse en el mercado industrial en la década del noventa y que desde entonces ha tenido un gran auge.

Entre los productos proteicos del suero, además de los concentrados con distintas proporciones de proteína, también se encuentran los aislados de proteínas (WPI por sus siglas en inglés, "whey protein isolates") y proteínas aislados como la α–lactalbúmina, β–lactoglobulina, lactoferrina y otras inmunoglobulinas. Todos estos productos se obtienen por diafiltración o cromatografía de intercambio iónico.

Los productos derivados del suero de queso son considerados como productos GRAS (sustancias generalmente reconocidas como seguras, por sus siglas del inglés "generally recognized as safe") por el Departamento de Administración de Alimentos de Estados Unidos (USFDA), y presentan un amplio rango de aplicaciones debido a su variada funcionalidad.

1.2.3. Propiedades funcionales de las proteínas lácteas.

Para explicar el complejo comportamiento funcional de las proteínas lácteas se presenta un esquema (**Figura 1**) que muestra los diferentes factores que afectan a estas propiedades.

Las proteínas nativas, tal y como son sintetizadas por la vaca, (parte superior de la **Figura 1**) reflejan un número de propiedades funcionales en solución acuosa (parte central de la **Figura 1**) las cuales son modificados durante el procesado de los alimentos. En esta secuencia, las propiedades funcionales son el resultado de propiedades intrínsecas de las proteínas nativas y de un número de factores extrínsecos.

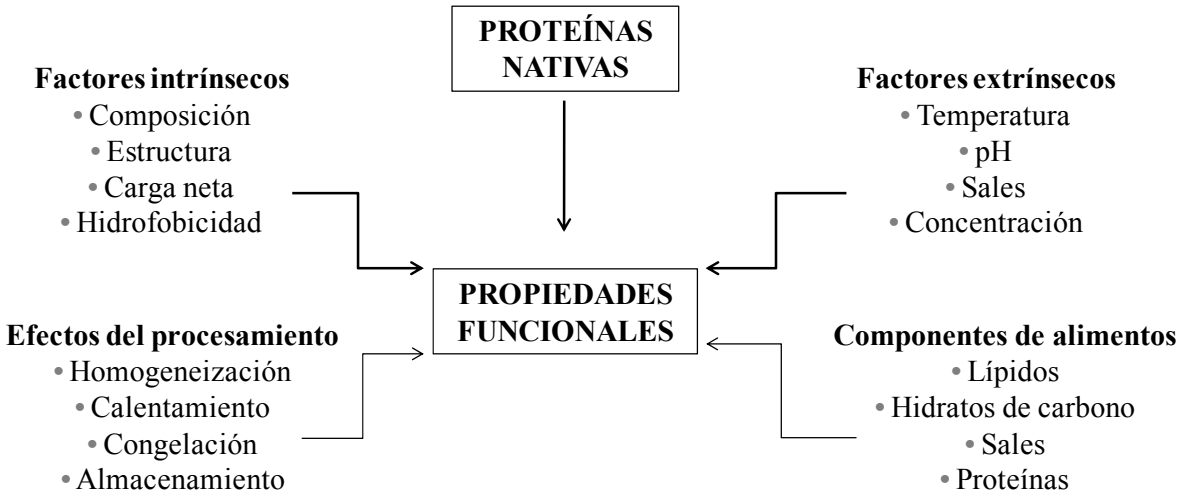


Figura 1. Esquema de las factores que influyen sobre las propiedades funcionales de las proteínas del suero (adaptado de *de Wit (1998)*).

El conocimiento de la relación entre las propiedades intrínsecas de las proteínas y los factores extrínsecos tales como temperatura, pH, sales, y concentración de proteína es muy importante para deducir y controlar las propiedades funcionales. Estas características funcionales, sin embargo, dan información sobre la historia del proceso y la composición del suero proteico involucrado en el producto. Además, las propiedades funcionales definen el comportamiento de las proteínas del suero en los alimentos y refleja la manera en la cual las proteínas interactúan con otros componentes de un alimento, tales como lípidos, azúcares, sales y otras proteínas, como se indica en la **Figura 1**. Estas interacciones son gobernadas por los efectos del procesado y de las condiciones de almacenamiento. Así, casi todas las aplicaciones requieren atributos funcionales específicos para obtener el comportamiento deseado, el cual usualmente es alcanzado por prueba y error.

Las proteínas del suero son muy usadas como ingredientes en alimentos debido a sus propiedades funcionales únicas: emulsificación, gelificación, espumado, capacidad de retención de agua, entre otras. Pero además, la demanda actual no tiene que ver sólo con ingredientes funcionales, sino también saludables.

Numerosas investigaciones sugieren que las proteínas del suero son capaces de brindar diferentes beneficios nutricionales, biológicos y fisiológicos. Algunos de estos incluyen

actividad antioxidante, mejora de la inmunidad de inmunodeprimidos, actividad anticancerígena, efectos antitumorales, efectos sobre la movilidad gastrointestinal, actividad bacteriostática, etc *(Brody, 2000; Demetriades, Bryant & McClements, 1998; El-Salam, El-Shibiny & Buchheim, 1996; Thomä-Worringer, Sørensen & López Fandiño, 2006)*.

En la **Tabla 3** se muestran algunas de las aplicaciones de las proteínas del suero en la industria de alimentos *(Cayot & Lorient, 1996; Damodaran, 1997)*.

Tabla 3. Funcionalidad y aplicación de las proteínas del suero en alimentos.

FUNCIÓN	MECANISMO	ALIMENTO
Solubilidad	Hidrofilicidad	Bebidas
Gelificación	Retención e inmovilización de agua, formación de red	Carnes, geles, tortas, quesos, productos panificados
Cohesión–adhesión	Uniones hidrofóbicas, iónicas y puente hidrógeno	Carnes, salsas, pastas, productos panificados
Emulsificación	Adsorción y formación de películas en la interfase	Salsas, sopas, tortas, aderezos
Espumado	Adsorción interfacial y formación de películas	Coberturas para tortas, helados, postres, tortas
Liga de grasa y flavour	Retención, uniones hidrofóbicas	Roscas rellenas de mermeladas, panificados bajos en grasa

Además, el elevado valor biológico de las proteínas del suero (**Tabla 4**) es una de las razones por las que los concentrados de suero se emplean también en formulaciones alimentarias infantiles *(Martin Diana, 2001)*.

Tabla 4. Tabla comparativa del valor biológico entre las proteínas del suero y otras proteínas alimentarias.

PROTEÍNA	VALOR BIOLÓGICO
Proteína de suero	100
Proteína de huevo	97
Proteína de leche	88
Proteína de soja	71
Caseína	70

1.2.4. β–lactoglobulina.

Como se mostró en la **Tabla 2**, la β–lactoglobulina (β–lg) es la proteína más abundante del suero lácteo (50 – 65 % del suero y 7 – 12 % del total de las proteínas de la leche). Es una proteína globular con una cadena polipeptídica simple de 162 aminoácidos y tiene un peso molecular de alrededor de 18,4 kDa.

Existen diferentes variantes genéticas de la β–lg, entre ellas las más abundantes son la variante A y la B *(Eigel et al., 1984)*. Estas variantes difieren en la sustitución de una glicina en la variante B por un ácido aspártico en la variante A *(Kilara & Vaghela, 2004)*. Ambas estructuras están estabilizadas por dos uniones disulfuro (entre Cys 160 – Cys 66 y Cys 119 – Cys 106) y también contienen un grupo sulfidrilo libre (Cys 121). A pesar de diferencias menores en la composición de aminoácidos entre las diferentes variantes genéticas, todas poseen un alto contenido de aminoácidos esenciales *(Phillips, Whitehead & Kinsella, 1994a)*. En la **Figura 2** se muestra la estructura primaria de una de las variantes genéticas de la β–lg, la variante A.

1										**11**									
Leu	Ile	Val	Thr	Gln	Thr	Met	Lys	Gly	Leu	Asp	Ile	Gln	Lys	Val	Ala	Gly	Thr	Thr	Trp
21										**31**									
Ser	Leu	Ala	Met	Ala	Ala	Ser	Asp	Ile	Ser	Leu	Leu	Asp	Ala	Gln	Ser	Ala	Pro	Leu	Arg
41				**Gln in Variant D**						**51**					**Variant C His**				
Val	Tyr	Val	Glu	Glu	Leu	Lys	Pro	Thr	Pro	Glu	Gly	Asp	Leu	Glu	Ile	Leu	Leu	**Gln**	Lys
61			**Gly in Variants B, C**							**71**									
Asp	Glu	Asn	**Asp**	Glu	Cys	Ala	Gln	Lys	Lys	Ile	Ile	Ala	Glu	Lys	Thr	Lys	Ile	Pro	Ala
81										**91**									
Val	Phe	Lys	Ile	Asp	Ala	Leu	Asn	Glu	Asn	Lys	Val	Leu	Val	Leu	Asp	Thr	Asp	Tyr	Lys
101										**111**			**Variants B, C Ala**						
Lys	Thr	Leu	Leu	Phe	Cys	Met	Glu	Asn	Ser	Ala	Glu	Pro	Glu	Gln	Ser	Leu	**Val**	Cys	Gln
121										**131**									
Cys	Leu	Val	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Asp	Asp	Glu	Ala	Leu	Glu	Lys	Phe	Asp	Lys	Ala	Leu
141										**151**									
Lys	Ala	Leu	Pro	Met	His	Ile	Agr	Leu	Ser	Phe	Asn	Pro	Thr	Gln	Leu	Glu	Glu	Gln	Cys
161	**162**																		
His	Ile	OH																	

Figura 2. Estructura primaria de la β–lg bovina A. Se indica la ubicación de las sustituciones en las distintas variantes genéticas *(Kilara & Vaghela, 2004)*.

La β–lg ha sido estudiada mediante dicroísmo circular y espectroscopía infrarroja para la determinación de su estructura secundaria y se ha reportado que contiene 10 – 15 % de estructura α–hélice, 43 % de regiones β–planas y 47 % de estructura desordenada *(Timasheff,*

Townend & Mescanti, 1966). Un trabajo más reciente *(Verheul, Pedersen, Roefs & de Kruif, 1999)* describe al monómero de β–lg como una estructura esférica de 4 nm de diámetro.

La estructura nativa de una proteína es una red tridimensional que resulta de un balance de varias fuerzas atractivas y repulsivas que ocurren entre diferentes partes de la cadena polipeptídica y entre la cadena polipeptídica y las moléculas del solvente *(Relkin, 1996)*. La conformación tridimensional de la β–lg nativa se muestra en la **Figura 3** *(Phillips et al., 1994a)*.

La presencia simultánea de dos uniones disulfuro y de un grupo tiol libre le imparte a la molécula de la β–lg una estructura espacial rígida.

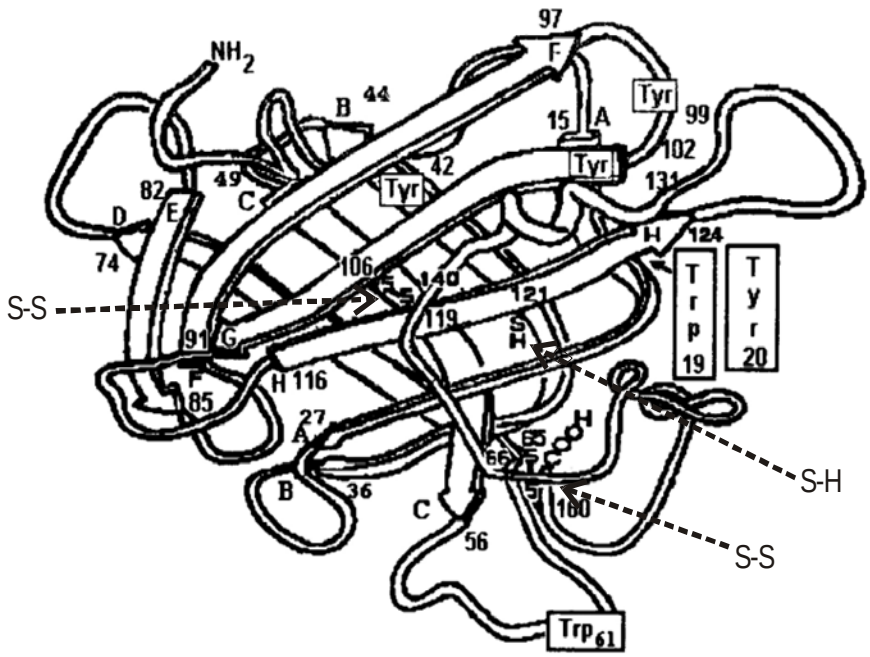


Figura 3. Estructura tridimensional de la β–lactoglobulina bovina. Las flechas indican las zonas planas β, nominadas con letra. También se indica la ubicación de las uniones disulfuro y del grupo tiol libre *(Phillips et al., 1994a)*.

Existe un acuerdo general sobre la ubicación de uno de los grupos disulfuro (Cys 66 – Cys 160), pero la ubicación del otro no es precisa, pudiendo estar localizado entre los residuos Cys 106 y Cys 119 o Cys 121 *(Relkin, 1996)*. Por último, la posición del grupo tiol libre es también imprecisa, y parece estar repartida entre los residuos Cys 119 y Cys 121. La

conformación de la molécula de la β–lg es fuertemente dependiente del pH. Según la conformación, el grupo tiol estará más o menos accesible y podrá participar en los intercambios de uniones disulfuro, que condicionan numerosas características y en particular la solubilidad.

El punto isoeléctrico (pI) de la β–lg se encuentra entre 4,6 y 5,2 según la variante genética *(Barnett & Bull, 1960; Bromley, Krebs & Donald, 2005; Das & Kinsella, 1989; Harnsilawat, Pongsawatmanit & McCelments, 2006; Haug, Skar, Vegarud, Langsrud & Draget, 2009; Townend, Herskovits, Swaisgood & Timasheff, 1964)*. Por debajo de pH 3 y por encima de pH 7, la β–lg existe como monómero. Entre pH 3,1 y 5,1 a bajas temperaturas y altas concentraciones de proteína, la β–lg se asocia hasta en forma octamérica. Esta polimerización se da por medio de los grupos carboxilos, de esta manera, la variante A tiene más posibilidad de formar octámeros que la variante B por la presencia de un ácido aspártico más, en el lugar que la variante B tiene glicina. A otros valores de pH, incluyendo el pH natural de la leche (pH 6,5), la β–lg se presenta generalmente en forma dimérica *(Kilara & Vaghela, 2004)*. Esta asociación entre monómeros de β–lg se debe a interacciones electrostáticas entre los residuos Asp 130 y Glu 134 con los residuos de lisina en la molécula vecina.
La disociación del dímero en monómeros de β–lg a pH mayor a 7 coincide con un aumento de actividad en el grupo tiol. Por lo tanto, los reactivos que estabilizan la conformación nativa o asociada en dímeros de β–lg podrían reducir la actividad del grupo tiol libre al quedar ocultos en el interior de las moléculas asociadas.
La asociación que se da entre las moléculas de proteína en diferentes condiciones del medio afecta la estabilidad de la misma frente a la desnaturalización irreversible ya que limita la exposición de grupos ocultos (disulfuro y tiol) en las zonas de unión de las moléculas y la consiguiente formación de enlaces covalentes entre las moléculas parcialmente desplegadas.

1.2.4.1. Propiedades biológicas de la β–lg.

La leche de todos los rumiantes tiene β–lg, mientras que la de casi todos los no rumiantes no la tiene. La β–lg tiene numerosas funciones biológicas entre ellas una alta eficiencia en la unión del retinol (provitamina A) *(Sawyer, Brownlow, Polikarpov & Wu, 1998)*. Es una fuente rica en cisteína, un aminoácido esencial que estimula la síntesis de glutatión que es un

tripéptido anticarcinogénico que protege contra tumores intestinales. Además, la estructura globular de la β–lg la hace muy estable contra las enzimas proteolíticas y los ácidos presentes en el estómago *(de Wit, 1998)*.
Debido a su predominancia en la leche bovina, también domina las propiedades de las proteínas del suero.

1.2.4.2. Propiedades funcionales de la β–lg.

Aunque la β–lg presenta una importante cantidad de residuos hidrofóbicos, es una proteína muy soluble en agua ya que la mayoría de los residuos no polares están ocultos en el interior de la molécula y la mayoría de los grupos polares están expuestos en la superficie *(Mangino, 1984)*. Además, relacionado con esta alta solubilidad en agua, la β–lg es muy activa superficialmente, lo que le proporciona buenas propiedades espumantes y emulsificantes. Sin embargo, las propiedades superficiales dependen mucho del estado de desnaturalización que presenta la proteína; por lo tanto, estas propiedades se verán modificados por las condiciones del medio como el pH, fuerza iónica, etc *(Cayot & Lorient, 1996)*. La capacidad de ligar agua depende también del estado estructural de la molécula, la β–lg es capaz de ligar agua y estabilizar productos luego de la cocción como por ejemplo, emulsiones cárnicas, salsas, etc. cuando el pH es cercano a la neutralidad. La ausencia de sinéresis en productos hidratados es un criterio muy importante de calidad en la aceptabilidad de un producto por lo tanto esta característica de la β–lg es de suma importancia.
La capacidad gelificante de la β–lg la ubica entre las proteínas más estudiadas. La gelificación de esta proteína puede lograrse por adición de sales y enzimas a una solución de β–lg concentrada (el valor de concentración crítica para gelificación depende del pH), a pH extremos o por calentamiento *(Clark, Kavanagh & Ross-Murphy, 2001; Kilara & Vaghela, 2004)*.

1.2.5. Caseinoglicomacropéptido.

El caseinoglicomacropéptido (CMP) es un péptido de 64 aminoácidos que, como se mencionó anteriormente, se forma a partir del clivaje de la κ–caseína por quimosina o pepsina durante la elaboración del queso *(Delfour, Jolles, Alais & Jolees, 1965)*. Es un grupo heterogéneo de

péptidos que tienen la misma cadena peptídica pero varían en su contenido de carbohidratos y fósforo. Existen dos variantes genéticas principales del CMP (la variante A y la B) provenientes de las dos variantes genéticas de κ–caseína (A y B) que difieren en dos aminoácidos: en la posición 136 la variante A posee treonina y la B isoleucina, mientras que en la posición 148, la A posee un residuo de ácido aspártico y la B alanina *(Oliva, Escobar & Ponce, 2002)*. En la **Figura 4** se muestra un esquema de la estructura primaria del CMP con los sitios potenciales de glicosilación y fosforilación.

El CMP constituye entre el 15 y 20 % de las proteínas en el suero de queso *(El-Salam et al., 1996; Thomä-Worringer et al., 2006; Wang & Lucey, 2003)*. Según presente o no carbohidratos unidos a la cadena peptídica el CMP puede ser glicosilado (gCMP) o no glicosilado (aCMP). En el gCMP uno de los carbohidratos más comúnmente presentes es el ácido N–acetilneuroamínico (ácido siálico).

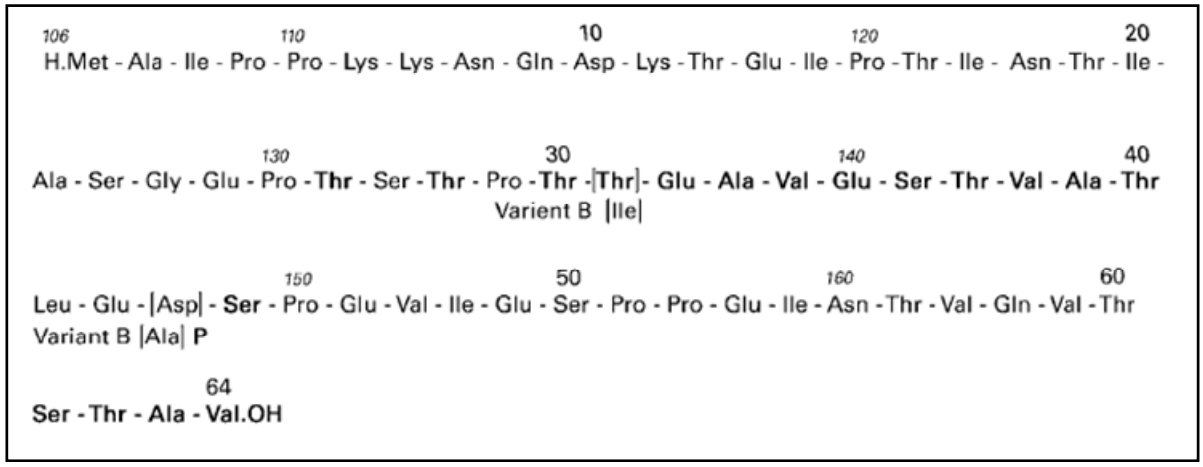


Figura 4. Estructura primaria de la variante genética A y B del CMP *(Eigel et al., 1984; Whitney, 1988)*. Los aminoácidos entre paréntesis son los sitios correspondientes a diferencias en la variante B que se indican debajo de cada paréntesis. Los pequeños números en cursiva indican la secuencia de aminoácidos en base a la κ–caseína. Los sitios de glicosilación y fosforilación se señalan en negrita.

El valor preciso del pI del CMP depende de la naturaleza y el contenido de cadenas de carbohidratos que presenten y del grado de fosforilación *(Cherkaoui, Doumenc, Tachon, Neeser & Veuthey, 1997; Kreuß, Krause & Kulozik, 2008; Lieske, Konrad & Kleinschmidt, 2004; Nakano & Ozimek, 2000)* y se ha reportado que es 3,15 y 4,15 para gCMP y aCMP, respectivamente *(Kreuß, Strixner & Kulozik, 2009)*. El menor valor del pI de la forma

glicosilada se debe a la presencia de un alto contenido de ácido siálico, que es un azúcar con un pK de 2,2, lo que disminuiría el pI del péptido *(Kreuß et al., 2009; Nakano & Ozimek, 2000; Silva-Hernández, Nakano & Ozimek, 2002)*.

Ono (1987) estudió la conformación de la molécula de CMP por dicroísmo circular y sugirió que tiene una estructura muy poco organizada. En la **Figura 5** se muestra una representación de la estructura tridimensional de la molécula de CMP y se observa efectivamente que tiene una estructura simple.

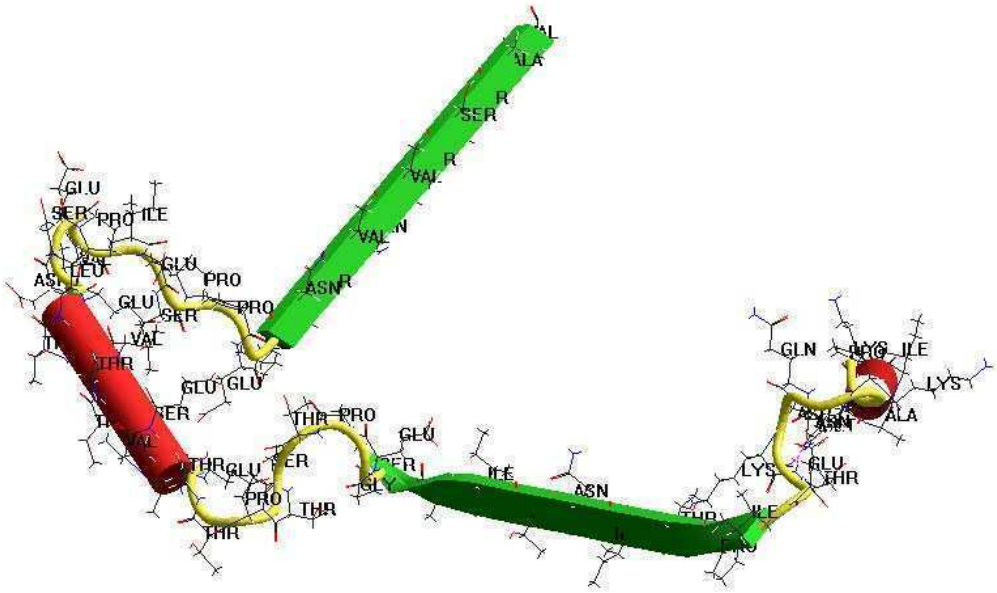


Figura 5. Representación tridimensional del CMP.

Existen pocos trabajos sobre el estado de asociación del CMP y además los resultados son contradictorios. El peso molecular (PM) del CMP difiere entre el aCMP (6,8 kDa) y el gCMP (entre 7,1 para la forma menos glicosilada y 11 kDa para la isoforma altamente glisosilada) *(Holland, Deeth & Alewood, 2006)*. Sin embargo, el PM aparente detectado por filtración en gel fue entre 20 y 50 kDa a pH 7 y entre 10 y 30 kDa a pH 3,5 *(Kawasaki, Isoda, Shinmoto, Tanimoto, Dosako & Idota, 1993a; Minkiewicz, Slangen, Lagerwerf, Haverkamp, Rollema & Visser, 1996; Nakano & Ozimek, 2002; Xu, Sleigh, Hourigan & Johnson, 2000)*. Estos cambios dependientes del pH fueron atribuidos al autoensamblaje del CMP conducido por la formación de oligómeros a través de interacciones no covalentes a pH neutro y la disociación parcial de estos oligómeros a pH ácido *(Kawasaki, Kawakami, Tanimoto, Dosako, Tomizawa*

& Kotake, 1993b; Xu et al., 2000), aunque algunos autores no están de acuerdo con estos resultados *(Mikkelsen et al., 2005)*.

1.2.5.1. Actividades biológicas del CMP.

Las actividades biológicas del CMP han sido muy estudiadas en los últimos años *(Brody, 2000; Dziuba & Minkiewicz, 1996; El-Salam et al., 1996; Kawasaki et al., 1993a; Kawasaki, Isoda, Tanimoto, Dosako, Idota & Ahiko, 1992; Manso & López Fandiño, 2004; Oh, Worobo, Kim, Rheem & Kim, 2000; Thomä-Worringer et al., 2006)*. Entre ellas se puede resaltar la habilidad del CMP para modular las respuestas del sistema inmune, promover el crecimiento de bifidobacterias, suprimir las secreciones gástricas, regular la circulación de la sangre, inhibir la unión de las toxinas del cólera a los oligosacáridos receptores en las paredes celulares y proteger a las células de la infección por el virus influenza. Otra particularidad del CMP es que tiene poca cantidad de aminoácido metionina, lo que lo hace un ingrediente útil para pacientes con problemas hepáticos. Además, el hecho de que el CMP no tiene fenilalanina en su composición aminoacídica, lo hace adecuado para la nutrición para pacientes con fenilcetonuria. El contenido de ácido siálico también otorga bioactividad, ya que éste contribuye al funcionamiento de las membranas celulares y los receptores de membrana y al normal desarrollo del cerebro.

Todas estas actividades biológicas demuestran que el CMP posee una amplia gama de posibilidades para su utilización en diversos tipos de alimentos. Sin embargo, para poder ser aplicado es muy importante conocer las propiedades funcionales de este péptido.

1.2.5.2. Propiedades funcionales del CMP.

El CMP bovino es muy soluble en agua en un amplio rango de pH, aún en condiciones acídicas y no es afectado por tratamientos térmicos. Otro atributo del CMP es su buena capacidad emulsionante, con una actividad máxima a pH alcalino y mínima en el rango de pH 4,5 – 5,5, sin embargo su estabilidad se deteriora después de 24 h de almacenamiento, principalmente a pH neutro y alcalino *(Chobert, Touati, Bertrandharb, Dalgalorrondo & Nicolas, 1989)*. El CMP presenta muy buena capacidad espumante pero la estabilidad no es buena *(Marshall, 1991)*. *Thomä Worringer, Siegert & Kulozik (2007)* estudiaron la

interacción del CMP con proteínas del suero sobre las propiedades espumantes y encontraron que el CMP y las proteínas del suero se complementan porque mientras el CMP es más eficiente para reducir la tensión superficial y asegurar un alto contenido de gas durante la formación de la espuma, las proteínas del suero son capaces de reducir la permeabilidad del gas y de inhibir la coalescencia de las burbujas debido a la generación de películas estables en la interfase.

Con respecto a las propiedades gelificantes existen escasos y contradictorios estudios. *Burton & Skudder (1987)* encontraron que una solución al 9,3 % de CMP gelificó a pH 4,5 a 20 °C, pero no cuando se calentó a 90 °C. Sin embargo, *Marshall (1991)* no pudo reproducir estos resultados. Por otro lado, *Ahmed y Ramaswamy (2003)* reportaron que una solución de CMP al 12,5 % gelificó a 80 °C a pH 7.

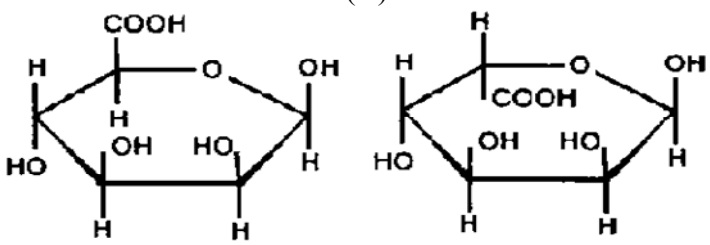
2. Polisacáridos.

2.1. Alginatos.

Los alginatos se extraen de algas marinas pardas (*Phaeophyceae*). Una de las algas que proporciona la mayor fuente de alginatos es *Macrocystis pyrifera* (**Figura 6**), que se encuentra en muchas partes del mundo, como por ejemplo Estados Unidos, Gran Bretaña, Francia, España, Noruega, Canadá, Japón, Argentina, Chile y Australia *(Dziezak, 1991; Mendoza, 2009; Piriz, 1993)*. También se encuentran como mucílago extracelular secretado por ciertas especies de bacterias *(Morris, 1998)*.

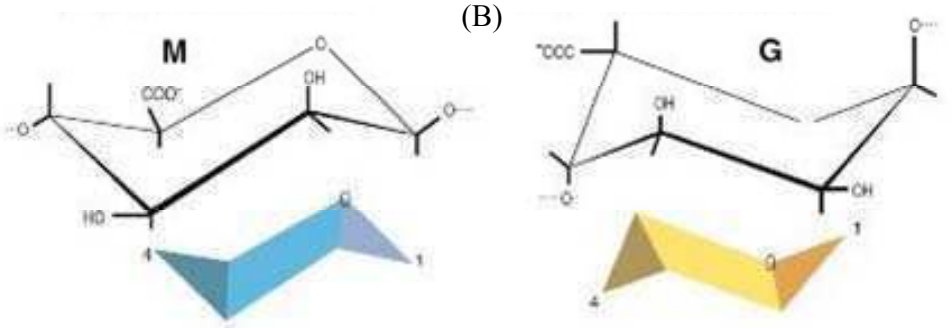
Los alginatos, las sales del ácido algínico, son polisacáridos lineales de alto peso molecular constituidos por dos unidades monoméricas, el ácido β–D–manurónico (**M**) y el ácido α–L–gulurónico (**G**) *(Dziezak, 1991)*. Estos se agrupan en bloques de secuencias **MM**, **MG**, unidos por enlaces glucosídicos β(1–4); y bloques **GG**, **GM**, unidos por enlaces glucosídicos α(1–4).
Las fórmulas clásicas de Haworth para los dos monómeros se muestran en la **Figura 6A**, mientras la **Figura 6B** ilustra las llamadas fórmulas de silla que permiten ver en forma más clara el arreglo tridimensional de las moléculas.

(A)



ácido β-D-manurónico (**M**) ácido α-L-gulurónico (**G**)

(B)



ácido β-D-manurónico (**M**) ácido α-L-gulurónico (**G**)

Figura 6. Estructura química de alginatos: (A) fórmulas clásicas de las dos unidades monoméricas del ácido algínico, (B) fórmulas en formas de silla.

La gran variedad de aplicaciones de estos productos se basa en la habilidad natural que poseen en el control del comportamiento del agua, lo que científicamente se conoce como propiedad hidrocoloide, y en su reactividad frente al calcio; ambas propiedades son consecuencia de la geometría molecular. Se ha demostrado que la cadena polimérica que constituye el ácido algínico y sus sales se compone de tres tipos de regiones o bloques. Los bloques **G** contienen solo unidades derivadas del ácido L–gulurónico, los **M** se basan enteramente en ácido D–manurónico y las regiones **MG**, que consisten en unidades alternadas de ambos ácidos.

En la **Figura 7** se muestran las configuraciones espaciales que adoptan los bloques **M** y **G** debido a los diferentes enlaces glucosídicos entre los carbonos C–1 y C–4 de las unidades monoméricas.

Las regiones de bloques **M** corresponden a la unión **M**–**M** (**Figura 7A**) y son segmentos de cadenas lineales, los bloques **G** que comprende la unión **G**–**G** presentan una estructura en forma de bucle (**Figura 7B**) y por último las regiones de bloques **MG** comprenden la unión de **M**–**G** y son segmentos alternados de ambas formas (**Figura 7C**).

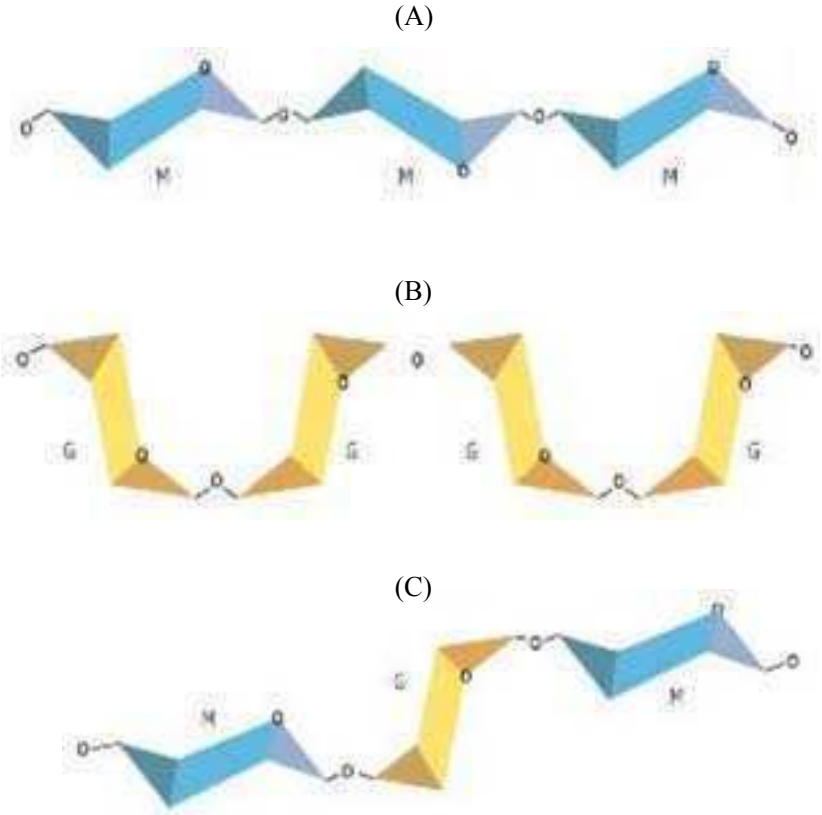


Figura 7. Segmentos de bloques: (A) **M**, (B) **G** y (C) **MG**.

Cuando dos cadenas de bloques **G** se alinean lado a lado resulta un hueco en forma de diamante, el cual tiene la dimensión ideal para acomodar en su interior un ión calcio, formándose una estructura dimérica. Este modelo fue propuesto por *Grant, Morris, Rees, Smith & Thom (1973)* (modelo caja de huevo o "egg–box model") para explicar las propiedades gelificantes de los alginatos al reaccionar con sales cálcicas. Lo importante es destacar que, según los porcentajes de regiones de bloques **G** y **M**, que varían en las distintas especies de algas, serán las características de los geles de alginatos.

La importancia de los alginatos como insumo para la industria alimentaria, farmacéutica y química en general, está dada por su propiedad hidrocoloide; esto es, su capacidad de hidratarse en agua caliente o fría para formar soluciones viscosas, dispersiones o geles. Los alginatos son, de esta manera, únicos en cuanto a sus propiedades como espesantes, estabilizantes, gelificantes y formadoras de películas, resultando en un sinnúmero de aplicaciones, que se detallan en la **Tabla 5** *(Imeson, 1990; Sanderson, 1986)*.

Tabla 5. Aplicaciones de los alginatos.

APLICACIONES ALIMENTICIAS	
Espesante, estabilizante o propiedades de suspensión en:	jugos de fruta salsas cremas cerveza
Propiedades gelificantes en:	alimento para animales gelatinas relleno de aceitunas
Propiedades de control en:	fabricación de quesos helados cubiertas de frutas en pastelería
APLICACIONES FARMACÉUTICAS	
Propiedades espesantes en:	jarabes emulsiones lociones cremas
Características de rápida hidratación en:	desintegración de tabletas control de irrigación de drogas
Propiedades gelificantes en:	polvos de impresión dental
APLICACIONES TEXTILES	
Propiedades espesantes en:	gomas para impresión baños de tinta
Propiedades de limpieza en:	sistemas reactivos de tinta sistemas de dispersión de tinta
OTRAS APLICACIONES INDUSTRIALES	
Propiedades de formación de película	industria de papeles calco sellado de conservas
Interacción con silicatos en:	electrodos de soldadura
Propiedades espesantes y estabilizantes en:	barnices para cerámicas pinturas cremosas

El alginato de propilenglicol (PGA) es un derivado del ácido algínico, en el cual parte de los grupos carboxilo se encuentran esterificados por medio de una reacción de oxidación con óxido de propileno. De acuerdo a la cantidad de grupos carboxilo que se encuentran esterificados, se obtienen PGA de diferente grado de esterificación, que varía generalmente entre 50 y 80 %. El PGA, aún a altos grados de esterificación, posee grupos carboxilos ionizados, los cuales hacen que existan fuertes repulsiones entre cadenas de polisacáridos y

posibilita su solubilidad en frío. El comportamiento de este polisacárido en solución es el de un material levemente pseudoplástico (dependiendo de su concentración en la solución) sin umbral de fluencia. Este tipo de alginato es comúnmente usado como espesante, ya que la alta ionización en solución hace que sea altamente hidrofílico.
Las soluciones de PGA son mucho menos sensibles a bajos valores de pH y cationes polivalentes, incluyendo iones calcio y proteínas. Por su tolerancia a iones calcio y su estabilidad en soluciones acídicas, el PGA tiene una importancia especial en la industria de productos lácteos *(BeMiller & Whistler, 1996; Gray, Griffiths, Stevenson & Kennedy, 1990; Kennedy, Griffiths, Philp, Stevenson, Kambanis & Gray, 1989)*.

2.2. Carragenanos.

Estos polisacáridos son extraídos de algas rojas siendo la fuente de carragenanos más importante y mejor conocida el alga *Chondrus crispus* que crece en las costas del Atlántico Norte, incluyendo Estados Unidos, Canadá, España, Portugal, Gran Bretaña y Francia *(Dziezak, 1991)* y en costas del Atlántico sur, incluyendo las costas de las provincias de Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego, en Argentina *(Mendoza, 2009; Piriz, 1993)*.

Los carragenanos están formados por unidades de galactosa y/o de anhidrogalactosa, sulfatadas o no, unidas por enlaces alternos α(1–3) y β(1–4) *(BeMiller & Whistler, 1996; Dziezak, 1991)*. El peso molecular es normalmente de 300 a 400 kDa. Dependiendo del grado de sulfatación, de las posiciones de los grupos sulfato y de la presencia de grupos de anhidrogalactosa se distinguen varios tipos de carragenano, con propiedades claramente distintas. Aunque existen alrededor de una docena de tipos, hay tres fracciones principales (**Figura 8**): iota (ι–C), kappa (κ–C) y lambda (λ–C) carragenano.

El κ–C está formado por unidades alternas de galactosa con un grupo sulfato en el carbono 4 y unidades de anhidrogalactosa sin sulfatar.
El ι–C está formado por unidades alternas de galactosa con un grupo sulfato en el carbono 4 y de anhidrogalactosa con un grupo sulfato en el carbono 2.
El λ–C está formado por unidades alternas de galactosa con un grupo sulfato en el carbono 2 y de anhidrogalactosa con dos grupos sulfato, uno en el carbono 2 y otro en el carbono 6.

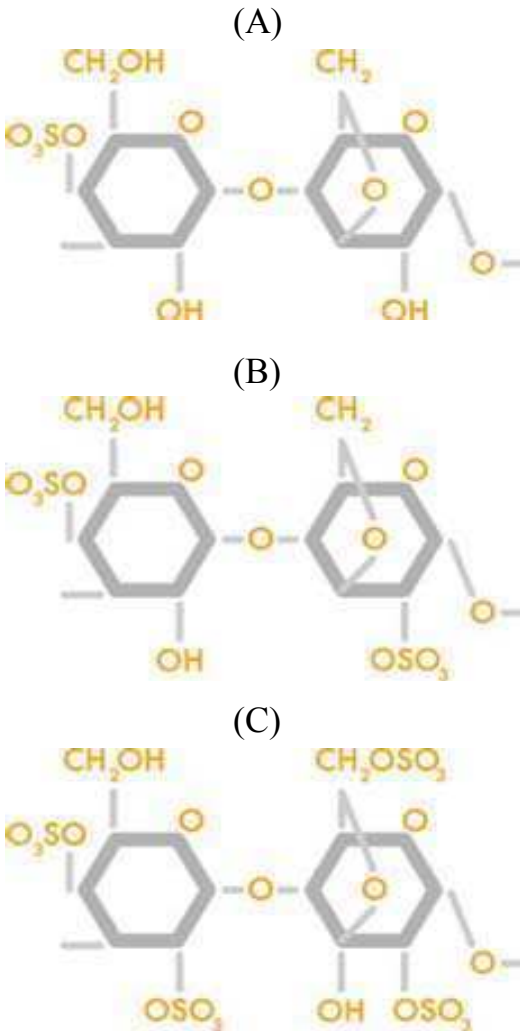


Figura 8. Estructura química de iota (ι–C), kappa (κ–C) y lambda (λ–C) carragenano *(Grupo Veni Vidi Vici, 2008)*.

A mayor proporción de grupos sulfato, la solubilidad es mayor, y a mayor proporción de grupos de anhidrogalactosa la solubilidad es menor. Los carragenanos se disuelven en agua para formar soluciones altamente viscosas. La viscosidad es estable en un amplio rango de valores de pH debido a que la mitad de los grupos sulfatos están siempre ionizados, aún bajo fuertes condiciones acídicas, dando a las moléculas una carga negativa *(BeMiller & Whistler, 1996)*.

Tanto el κ–C como el ι–C son capaces de formar geles. A temperaturas elevadas, las cadenas se encuentran desenrolladas y dispuestas al azar. Al bajar la temperatura, las cadenas de

polisacárido se asocian por puentes de hidrógeno formando hélices dobles, quedando hacia el exterior los grupos sulfato y los puentes de la anhidrogalactosa. Estas interacciones no suelen ser suficientes para formar un gel, ya que las cargas de los grupos sulfato hace que las hélices se repelan. Dependiendo de la presencia de iones que neutralicen los sulfatos, y del tipo de carragenano, las hélices pueden agruparse entre ellas una vez formadas, produciéndose entonces primero la formación del gel, en el que las zonas desorganizadas son las que retienen la mayoría del agua, y eventualmente la compactación del gel y la sinéresis.
Las propiedades reológicas, y especialmente la capacidad de formación de geles, varía mucho dependiendo del tipo de carragenano.

El λ–C, tiene el mayor contenido de grupos sulfatos y consecuentemente mayor carga negativa, creando una fuerte repulsión electrostática entre las cadenas lo que lo hace altamente soluble en frio. Este carragenano no forma geles por sí mismo. Forma disoluciones pseudoplásticas, con un comportamiento no newtoniano en cuanto a la viscosidad, por lo que se lo utiliza como agente espesante.

El κ–C, por el contrario, es soluble en caliente (70 °C) y presenta muy buenas propiedades gelificantes, forma geles rígidos y quebradizos en presencia de iones potasio. Estos geles son muy propensos a la sinéresis, tanto más cuanto mayor sea la concentración de potasio, y no resisten la congelación/descongelación, siendo la sinéresis aún mayor en presencia de iones calcio. El κ–C se utiliza en concentraciones entre 0,02 % y 2 %.

El ι–C, forma geles en presencia de iones calcio que son elásticos, sin tendencia a la sinéresis y que resisten la congelación. Este carragenano es soluble a 40 – 50 °C. Este tipo de carragenano mejora las propiedades de los geles de almidón, evitando la sinéresis y permite obtener geles mucho más resistentes.

Tanto el κ–C como el ι–C forman geles mixtos con las proteínas de la leche, geles que se asemejan en sus propiedades a los del polisacárido, es decir son quebradizos en el caso del κ–C y elásticos en el caso del ι–C. Sin embargo, no presentan tendencia a la sinéresis, como el κ–C. La unión del polisacárido y la caseína es de tipo iónico, entre las cargas negativas del carragenano y las positivas de la zona externa de la micela. Esta asociación aumenta mucho la

resistencia del gel, de tal forma que se pueden obtener productos sólidos, como postres lácteos, con una concentración de carragenano de apenas el 0,2 %.

La variabilidad de las propiedades de los carragenanos en función de cuál sea el tipo predominante, los hace muy versátiles, y cada vez tienen más aplicaciones en la industria alimentaria. La interacción con las micelas de caseína hace que el carragenano tenga aplicaciones en todos los materiales que contienen leche. Además de formar geles, a concentraciones muy bajas, del orden del 0,02 % estabiliza suspensiones en medios lácteos, como batidos. También se comporta muy bien en productos cárnicos procesados y reestructurados, y en postres de tipo gelatina, mermeladas y derivados de frutas, siempre que el pH sea superior a 3,5.

2.3. Goma xántica.

La goma xántica es un exopolisacárido producido por *Xanthomonas camprestris*, un patógeno de las coles. Este polisacárido de alto peso molecular (del orden de 1000 kDa) fue la primera goma fabricada en gran escala por fermentación microbiana.

Su estructura está formada por un esqueleto de unidades de D–glucosa unidas entre sí por enlaces β(1–4), idénticos a los presentes en la celulosa. Una de cada dos glucosas se encuentra unida por un enlace α(1–3) a una cadena lateral formada por dos manosas con un ácido glucurónico entre ellas (**Figura 9**). Alrededor de la mitad de las manosas terminales de la cadena lateral están unidas a un grupo de piruvato, y el 90 % de las manosas más próximas a la cadena central están acetiladas en el carbono 6. La presencia de cadenas laterales junto a su carácter aniónico ayudan a su hidratación, haciéndola soluble en frío.

Las moléculas de goma xántica adoptan una conformación rígida en forma de hélices, las cuales no presentan tendencia a asociarse, razón por la cual, este polisacárido no posee propiedades gelificantes. Sin embargo, imparte una viscosidad elevada (en reposo) a bajas concentraciones (del orden del 1 %). Presenta además un comportamiento pseudoplástico con umbral de fluencia. Esta característica la convierte en el polisacárido ideal para estabilizar y dar viscosidad a productos que, como el ketchup, deben tener un comportamiento semejante a

un gel en reposo pero fluir casi libremente cuando se agita el envase para sacarlo de él. Su independencia de la temperatura y el pH, incluso hasta pH inferior a 2, hace que se pueda utilizar en una amplia gama de alimentos, hasta en alimentos muy ácidos, como salsas para ensalada.

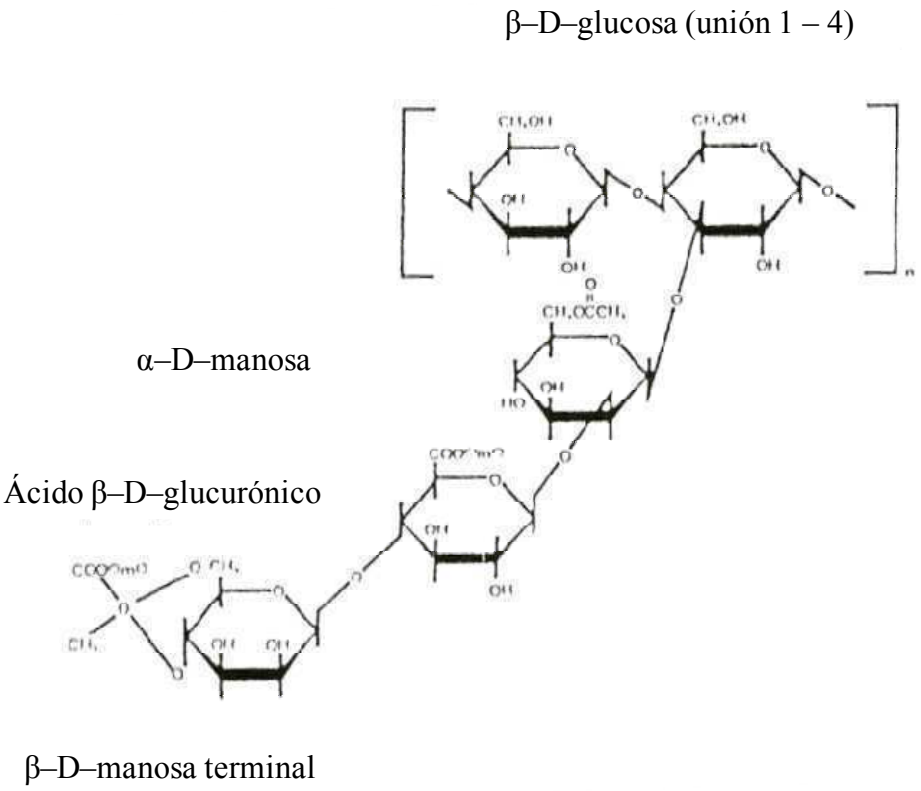


Figura 9. Estructura primaria de la goma xántica *(Sand, 1982)*.

La goma xántica también inhibe la retrogradación del almidón y la sinéresis de otros geles, estabiliza espumas, retrasa el crecimiento de cristales de hielo. Se comporta de forma sinérgica con la goma guar y con la goma de algarroba, formando geles blandos, elásticos y termorreversibles.

3. Interacciones entre biopolímeros.

Según las condiciones del medio en que se encuentre la proteína, ésta se comportará de diferentes maneras ante diferentes tratamientos, por ejemplo, el calentamiento, la adición de sales, la mezcla con otros biopolímeros. Todos estos comportamientos están dados por

diferentes tipos de interacciones entre las moléculas proteicas o entre ellas y las de otros biopolímeros como por ejemplo, otras proteínas y polisacáridos.

Las interacciones entre estos biopolímeros involucran diferentes tipos de fuerzas intermoleculares que se describen en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Tipos de fuerzas intermoleculares que contribuyen a las interacciones entre biopolímeros.

Covalentes: unión muy fuerte formada entre grupos reactivos específicos de diferentes macromoléculas. Por ejemplo, uniones por puente disulfuro.
Electrostáticas: interacción que puede ser repulsiva o atractiva según las cargas eléctricas sean de signo igual u opuesto, respectivamente. La fuerza de estas interacciones disminuye con el aumento de la fuerza iónica.
Volúmenes de exclusión: es una interacción repulsiva dada por el gran volumen ocupado por algunos biopolímeros en solución, produciendo un importante efecto sobre la exclusión estérica, es decir hay una reducción en el volumen disponible a ser ocupado por una molécula de biopolímero.
Uniones hidrógeno: interacción atractiva moderadamente fuerte entre átomos de hidrógeno y otros átomos mucho más electronegativos. Las uniones puente hidrógeno son menos importantes cuando aumenta la temperatura.
Hidrofóbicas: interacción atractiva moderadamente fuerte de origen entrópico entre grupos no polares. Las uniones hidrofóbicas aumentan su fuerza con el aumento de la temperatura.
Puentes iónicos: tipo específico de interacción que involucra la unión de cationes polivalentes (especialmente Ca^{+2}) con dos grupos aniónicos diferentes.
Van der Waals: interacción atractiva débil de origen electromagnético entre grupos con dipolos inducidos o permanentes.

Fuente: *Dickinson (1998)* y *McClements (2006)*.

Estas interacciones pueden darse tanto en sistemas proteína–proteína como en sistemas proteína–polisacárido. La importancia relativa de estas interacciones en un sistema particular depende del tipo de biopolímero involucrado (peso molecular, densidad de carga en función del pH, flexibilidad, hidrofobicidad), las características de la solución (pH, fuerza iónica) y las condiciones ambientales (temperatura, cizalla) *(McClements, 2006)*.

Conociendo y manejando estos parámetros es posible controlar las interacciones entre los biopolímeros y por lo tanto crear atributos funcionales diferentes en un sistema alimentario.

3.1. Interacción proteína–proteína.

En muchos alimentos, las proteínas son fundamentales en la determinación de la mayoría de los atributos de calidad del producto final. No sólo el tipo y la concentración de proteína, sino también el método de procesamiento y las condiciones ambientales afectarán la microestructura, textura, apariencia y estabilidad del producto final.

Algunas de las consecuencias prácticas de las interacciones entre proteínas durante el procesamiento de alimentos son bien conocidas; en algunos casos es necesario controlar estas interacciones ya que pueden tener un impacto negativo sobre la calidad del producto. En leche, por ejemplo, las proteínas del suero interactúan con las micelas de caseína durante el calentamiento *(Corredig & Dalgleish, 1999)*, y su asociación está relacionada a un menor rendimiento del queso.

Aunque cada proteína es única, las asociaciones e interacciones proteicas en alimentos son moduladas por un balance de fuerzas manejadas por algunos mecanismos generales. El entendimiento de estos mecanismos nos permitirá el diseño de estructuras alimentarias nuevas y específicas.

3.1.1. Fuerzas de interacción.

El mecanismo que conduce a la asociación de cadenas polipeptídicas en estructuras proteicas tridimensionales es el punto de partida para comprender las interacciones proteína–proteína en gran escala.

En la cadena polipeptídica de la mayoría de las proteínas existen porciones que están organizadas en una estructura definida, y forman cadenas tipo hélices, cadenas tipo láminas o cadenas curvas. Estas porciones constituyen la estructura secundaria de las proteínas y son el resultado de interacciones entre aminoácidos específicos. Las proteínas también se caracterizan por una configuración tridimensional única que es la estructura terciaria. Si se asocian estructuras terciarias independientes por medio de interacciones entre varias cadenas polipeptídicas, la proteína tendrá estructura cuaternaria.

Las proteínas en solución mantienen su conformación mediante un equilibrio de fuerzas hidrofóbicas, uniones hidrógeno, fuerzas van der Waals e interacciones electrostáticas (que

pueden ser atractivas o repulsivas). Además, la estructura terciaria y cuaternaria de una proteína podría estar estabilizada por la presencia de uniones covalentes entre aminoácidos, por ejemplo, uniones por puente disulfuro *(Corredig, 2006; Damodaran, 1997)*. Todas estas fuerzas fueron previamente descriptas en la **Tabla 6**.

La estructura de una proteína es dinámica, y el equilibrio entre las fuerzas estabilizantes de la estructura tridimensional puede cambiar a partir de cambios en las condiciones ambientales tales como temperatura, calidad del solvente, pH y presión o durante el procesamiento. El potencial de una proteína para modificar su conformación es fundamental para algunas de las propiedades funcionales más importantes de las proteínas: formación de geles, adsorción a interfases y estabilización de espumas y emulsiones.

Durante el procesamiento o con cambios en las condiciones ambientales, una proteína puede cambiar su conformación. Como consecuencia de estos cambios, las fuerzas que la estabilizan pueden debilitarse, permitiendo el desplegamiento o la desnaturalización proteica y exponiendo aminoácidos reactivos antes ocultos en el interior de la estructura proteica. Así estos aminoácidos reactivos pueden interactuar con aminoácidos de otra cadena polipeptídica vecina formando agregados.

La cadena polipeptídica contiene aminoácidos cargados, los cuales interactúan unos con otros causando atracción o repulsión de cadenas laterales. Al cambiar el pH en una solución proteica, ocurre una redistribución de cargas en la cadena polipeptídica, los grupos acídicos tienen una carga negativa a pH neutro mientras que los grupos básicos están cargados positivamente generalmente a este pH debido a que su punto isoeléctrico es alto. Las interacciones electrostáticas no actúan sólo localmente entre grupos específicos estabilizando la estructura terciaria de una proteína, sino también interactúan entre diferentes proteínas. La distribución de las cargas de la proteína causa atracción o repulsión electrostática. Estas interacciones electrostáticas son las fuerzas principales que actúan a cierta distancia.

Las proteínas no sólo deben exponer sus sitios reactivos, sino también deben tener una orientación óptima para que sean capaces de interactuar unas con otras. Las interacciones de corto rango son específicamente estéricas, y ésta es la razón por la cual la cinética de asociación es determinada por la velocidad de desnaturalización proteica.

A una distancia corta las proteínas pueden interactuar mediante fuerzas de van der Waals. Estas fuerzas son fuerzas atractivas débiles entre dipolos transientes. Estas fuerzas son inversamente proporcionales a la distancia entre moléculas. Las interacciones electrostáticas

no son tan importantes en el equilibrio de fuerzas que involucran la asociación molecular si hay iones presentes en la solución. Los iones apantallan las cargas presentes en las moléculas y disminuyen las fuerzas electrostáticas totales.

La presencia de aminoácidos cargados puede causar una coordinación específica con iones. Algunas proteínas son estabilizadas por puentes de sales específicos. Por ejemplo, la rigidez de la estructura tridimensional de la α–la es aumentada por los puentes de Ca^{+2} *(Kuwajima, Harushima & Sugai, 1986)*. En ausencia de calcio, la proteína tiene una estructura no tan rígida con una menor temperatura de desnaturalización *(Boye, Alli & Ismail, 1997)*. Los puentes iónicos no sólo estabilizan las estructuras terciaria y cuaternaria de la proteína, sino también participan en las interacciones proteína–proteína tales como la asociación de caseínas o la gelificación de proteínas globulares.

Otra fuerza que es importante en la interacción de moléculas proteicas es la unión puente hidrógeno. Las uniones hidrógeno están formadas por dipolos, por ejemplo los grupos amino y carboxilo de una proteína. La asociación de monómeros de β–lg en dímeros es conducida por uniones hidrógeno entre las estructuras lámina β de dos monómeros adyacentes *(Brownlow et al., 1997)*.

Las interacciones hidrofóbicas juegan un rol fundamental en las interacciones proteína–proteína y la presencia de aminoácidos no polares es considerada una característica muy importante en la determinación del potencial de una proteína como ingrediente "funcional". La hidrofobicidad superficial se emplea como un parámetro para predecir el potencial de una proteína para asociarse bajo calentamiento o bajo cambios de las condiciones ambientales y se relaciona con propiedades funcionales, tales como espumado y gelificación *(Nakai, 1983)*. Sin embargo, una porción de los aminoácidos no polares permanecen ocultos en el interior de la estructura proteica. Por eso, la suma de la contribución de todos los aminoácidos hidrofóbicos en la cadena polipeptídica no es una estimación fiable de la susceptibilidad de la proteína a interactuar con otras proteínas vía interacciones hidrofóbicas. La hidrofobicidad superficial de una proteína y sus cambios bajo calentamiento, cambios de pH y otras condiciones ambientales se pueden determinar mediante espectroscopía de fluorescencia, usando sondas fluorescentes que interactúan selectivamente con los aminoácidos no polares expuestos de una proteína *(Nakai, 1983)*.

Las interacciones proteína–proteína pueden también formarse por medio de interacciones covalentes entre aminoácidos de diferentes proteínas. La formación de uniones disulfuro entre

las gluteninas del trigo es fundamental para determinar la fuerza de la masa de pan *(Li & Lee, 2000)*. También se forman uniones covalentes durante el calentamiento de la leche entre β–lg, α–la y κ–caseína *(Corredig & Dalgleish, 1999)*. La formación de uniones disulfuro aumenta la firmeza y elasticidad en los geles de proteínas de suero formados bajo tratamiento térmico *(Vardhanabhuti & Foegeding, 1999)*.

3.1.2. Ensamblado de proteínas nativas.

Algunas proteínas alimentarias están presentes en la naturaleza en ensamblados moleculares complejos. Estas grandes estructuras cuaternarias son el resultado de un balance de varias fuerzas, y su composición es dinámica. Cualquier cambio en el pH, concentración, temperatura y otras condiciones ambientales afectarán el equilibrio entre interacciones hidrofóbicas, van der Waals, electrostáticas e iónicas *(Corredig, 2006)*.

Algunos ingredientes alimentarios disponibles comercialmente como caseínas, proteínas del suero, proteínas del huevo y proteínas de soja están constituidos por este tipo de agregados moleculares y su utilización podría ser muy aprovechada si se conociera el comportamiento de las diferentes proteínas presentes.

Los monómeros de proteínas pueden interactuar unos con otros creando estructuras supramoleculares constituidas por la misma proteína. β–lg, por ejemplo, forma dímeros mediante uniones hidrógeno. La estructura tipo lámina–β antiparalela se asocia con otra igual de otra molécula de proteína formando doce uniones hidrógeno en la superficie del dímero *(Brownlow et al., 1997)*. El equilibrio de la asociación de β–lg depende de la concentración de proteína, de la temperatura, del pH y de la fuerza iónica; como se mencionó anteriormente β–lg está presente como dímero a pH 6 – 7, mientras que por ejemplo a pH 3,5 la proteína está principalmente en la forma monomérica. Por medio de técnicas de dispersión de luz, se ha demostrado que el equilibrio se desplaza hacia la forma monomérica bajo condiciones que permiten la repulsión electrostática entre monómeros (a baja concentración de proteína, baja fuerza iónica o a temperaturas mayores a 40 °C) *(Aymard, Durand & Nicolai, 1996)*. Además, la disociación del dímero de β–lg parece estar acompañada por una modificación conformacional de la estructura proteica *(Qi, Brownlow, Holt & Sellers, 1995)*.

Otro ejemplo de estructura cuaternaria compleja son las micelas de caseína nativa en la leche. Su estructura es afectada por cambios en el ambiente *(Holt & Sawyer, 1993)*. Pequeñas

concentraciones de calcio interactúan con los residuos fosforilados presentes en zonas de αs1–αs2– y β–caseínas formando uniones y causando la precipitación de la proteína. La única caseína que no es afectada por el calcio es la κ–caseína. El caseinato de sodio es el resultado de la precipitación de las micelas por medio de la acidificación y es un ingrediente muy empleado en la industria alimentaria. Aunque los caseinatos cálcicos o sódicos tienen una composición proteica similar al de las micelas de caseína, sus propiedades funcionales son completamente diferentes debido a que sus interacciones no se asemejan a las presentes en la estructura cuaternaria original de las caseínas. El caseinato de sodio es un muy buen agente emulsificante debido a su flexibilidad en las interfases aire–agua o aceite–agua. Por otro lado, las fuertes interacciones entre caseínas en las micelas causan la formación de películas muy delgadas en la interfase y por lo tanto en este caso se necesitan cantidades muy grandes para preparar una emulsión estable *(Courthaudon et al., 1999; Dalgleish, 1997)*.

3.1.3. Interacciones proteína–proteína causadas por procesamiento.

Las operaciones unitarias de procesamiento tales como calentamiento, altas presiones, acidificación y mezclado de proteínas son diseñadas para afectar las interacciones proteína–proteína para obtener determinadas texturas y microestructuras. Por medio de cambios de las condiciones ambientales y de procesamiento es posible modular la extensión de los cambios estructurales de las proteínas y por lo tanto, afectar las cinéticas de agregación o de formación de sitios reactivos en las proteínas.

Cuando se mezclan diferentes proteínas, su compatibilidad o incompatibilidad podría causar la formación de diferentes texturas y microestructuras. La incompatibilidad entre diferentes proteínas en un sistema mixto puede resultar de repulsión electrostática o estérica causada por los agregados de proteínas. Si las proteínas están presentes en un sistema de fases separadas su comportamiento se verá restringido a un volumen mucho más pequeño, y ellas se comportaran como si estuvieran más concentradas *(Corredig, 2006)*.

3.1.3.1. Interacciones inducidas por calor.

Los tratamientos térmicos producen cambios estructurales en las proteínas que provocan que las proteínas interactúen entre sí. Las interacciones proteína–proteína inducidas por calor se

han estudiado mucho en la industria de alimentos ya que el tratamiento térmico es una de las operaciones unitarias más comunes en el procesamiento de alimentos.

Como se mencionó antes, durante el calentamiento, las proteínas cambian su conformación y exponen sitios reactivos antes ocultos dentro de su estructura tridimensional. Al exponerse regiones antes ocultas pueden generarse más interacciones de las antes mencionadas entre diferentes cadenas polipeptídicas.

La primera etapa del proceso de interacción inducida por calor puede ser reversible para algunas proteínas. Por ejemplo, los cambios estructurales de β–lg son reversibles, pero dependen de la concentración y la temperatura de calentamiento *(Iametti, Cairoli, De Gregori & Bonomi, 1995; Iametti, De Gregori, Vecchio & Bonomi, 1996)*. La recuperación de la estructura tridimensional original de una proteína puede depender también de otras proteínas presentes. En las proteínas lácteas, los cambios estructurales ocurren a una temperatura mucho menor para α–la que para β–lg *(Boye et al., 1997)*; sin embargo, α–la no se agrega (como sí lo hace la β–lg) pero forma complejos inducidos por calor con β–lg en el suero o leche y parece que juega un papel muy importante en la formación de agregados *(Dalgleish, 1997; Schokker, Singh & Creamer, 2000)*. Si hay más de una proteína presente en una solución, las interacciones inducidas por calor resultarán de un equilibrio entre las fuerzas atractivas y repulsivas y el comportamiento en la agregación dependerá del tipo y la relación de las proteínas presentes.

El calentamiento de la leche se ha estudiado en detalle debido al impacto de la pasteurización sobre su calidad y las características del procesamiento. En la leche, α–la y β–lg interactúan entre sí y con las micelas de caseína. Las interacciones covalentes mediante puentes disulfuro no ocurren sólo entre estas dos proteínas del suero sino también entre β–lg y κ–caseína; la magnitud de la interacción depende de la temperatura y el tiempo de calentamiento *(Corredig & Dalgleish, 1999)*. Estas interacciones tienen consecuencias tecnológicas muy importantes. El calentamiento afecta la producción de leche en polvo y dificulta la elaboración de queso. El tratamiento térmico de la leche, durante la elaboración de queso, a temperaturas mayores a 75 °C por tiempos prolongados produce un retardo en la formación del gel y una textura inferior de la cuajada *(Anema, 2001; Dalgleish, 1992; Graveland-Bikker & Anema, 2003)*.

Sin embargo, las interacciones inducidas por calor en leche no siempre son indeseables. El tratamiento térmico previo a la acidificación es un método muy común en la producción de

productos lácteos fermentados. La acidificación de la leche desde su pH natural hasta un cercano a pH 4,6 resulta en un gel que tiene mayor firmeza cuando se utiliza leche previamente calentada. Además, el calentamiento de la leche reduce la liberación de suero (sinéresis) en el yogurt y la gelificación ocurre en menor tiempo y a valores de pH mayores. Estos efectos fueron atribuidos a la asociación de las proteínas del suero desnaturalizadas con las micelas de caseína *(Lucey, Tamehana, Singh & Munro, 1998)*.

3.1.3.2. Efecto de las interacciones proteína–proteína en la gelificación inducida por calor.

Bajo calentamiento y condiciones ambientales particulares y a una concentración suficiente las proteínas forman redes tridimensionales en las cuales el agua está estrechamente unida o asociada en los espacios intersticiales.
El mecanismo de gelificación proteica no está completamente entendido aún y varía dependiendo de la proteína.
Más adelante se ampliará el efecto de las interacciones sobre el proceso de gelificación.

3.1.3.3. Efecto de las interacciones proteína–proteína en las interfases.

Las proteínas se adsorben en las interfases aire–agua o aceite–agua, creando películas que estabilizan espumas y emulsiones. No se ha prestado mucha atención a las interacciones que ocurren en la interfase entre proteínas vecinas a pesar de que existen muchas posibilidades para que ocurran interacciones en estos sistemas, debido a que en la interfase, hay mucha más densidad molecular que en el seno de la solución.
Las interacciones entre proteínas en la interfase se desarrollarán más adelante.

3.2. Interacciones proteína–polisacárido.

Las interacciones entre proteínas y polisacáridos también juegan un rol muy importante en la estructura y la estabilidad de muchos alimentos procesados.

Las propiedades funcionales de las proteínas, tales como solubilidad, actividad superficial, estabilidad conformacional, propiedades gelificantes, espumantes y emulsificantes se ven afectadas por su interacción con polisacáridos.

Las interacciones entre proteínas y polisacáridos se pueden dividir en dos grupos: interacciones atractivas y repulsivas entre diferentes macromoléculas y pueden estar dadas por los diferentes tipos de fuerzas definidas en la **Tabla 6**. Estos dos tipos de interacciones entre biopolímeros son las responsables de la formación de complejos y de la inmiscibilidad de biopolímeros, respectivamente.

Al mezclar una solución de proteínas con una de polisacáridos se puede observar alguno de los comportamientos que se representan en la **Figura 10**.

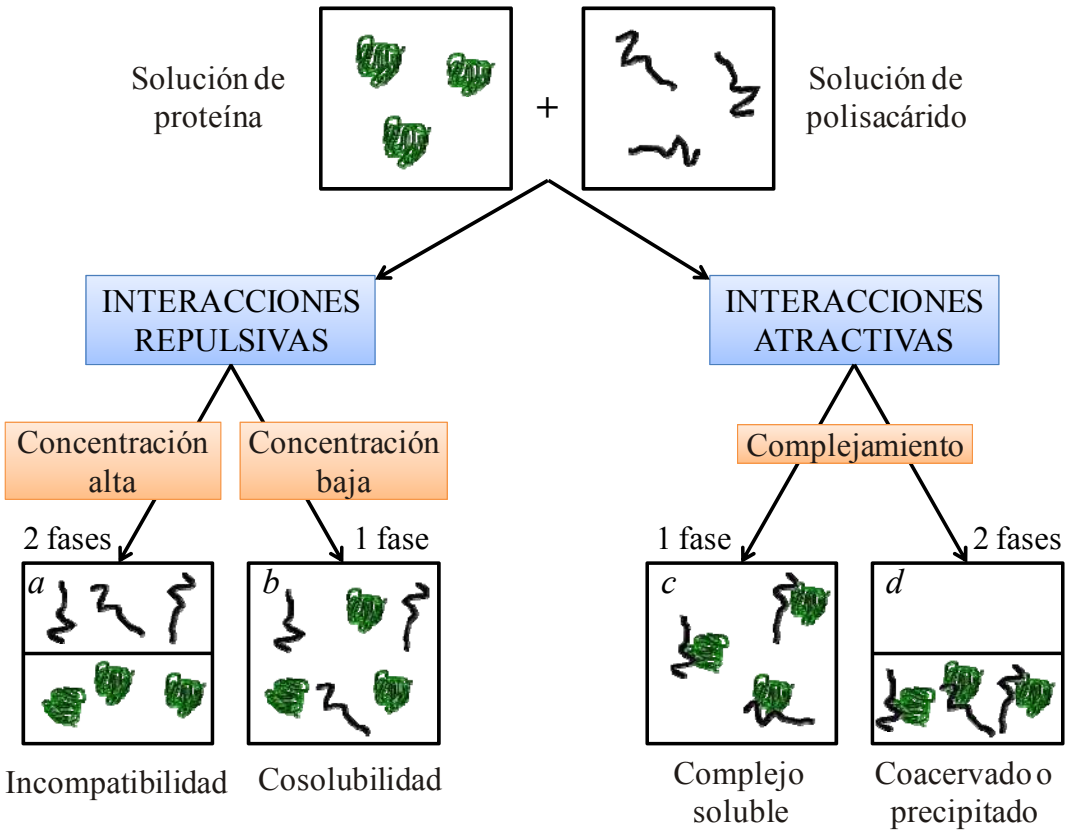


Figura 10. Representación esquemática de los cuatro posibles sistemas obtenidos por mezclar soluciones de una proteína y un polisacárido. Adaptado de *de Kruif & Tuinier (2001)* y *McClements (2006)*.

La interacción de los dos biopolímeros puede ser segregativa (los biopolímeros se repelen unos a otros y entonces se definen como incompatibles) o asociativa (los biopolímeros se atraen unos a otros) *(de Kruif & Tuinier, 2001; McClements, 2006; Tolstoguzov, 1986; Tolstoguzov, 2003)*.

En soluciones diluidas la mezcla es estable debido al efecto predominante de la entropía de mezclado y la proteína y el polisacárido son *cosolubles*: sistema *b*.

Cuando se aumenta la concentración de los biopolímeros pueden ocurrir fenómenos de asociación o segregación.

En condiciones en las que existe atracción entre las moléculas de los distintos biopolímeros (los biopolímeros poseen carga neta opuesta) puede producirse la formación de complejos no solubles que precipitan, obteniéndose dos fases separadas: una fase "coacervada" que contiene a los complejos y otra fase diluida, con baja concentración de ambos biopolímeros. Este fenómeno se llama "coacervación compleja" y es un fenómeno de *complejamiento*: sistema *d*.

En ciertos casos las atracciones electrostáticas pueden llevar a la formación de complejos solubles, obteniéndose un sistema de una sola fase. En este caso estamos en presencia del efecto de solubilidad por *complejamiento*: sistema *c*.

Y, por último, en condiciones donde predominan las fuerzas de repulsión entre los biopolímeros (ambos poseen la misma carga neta), puede obtenerse un sistema de dos fases (emulsión agua en agua) en el cual ambos componentes macromoleculares están concentrados en diferentes fases. Esto se debe a la incompatibilidad entre proteínas y polisacáridos en medio líquido, entonces estamos en presencia del fenómeno de *segregación*: sistema *a*.

La diferencia entre los sistemas líquidos de dos fases *a* y *d* reside en que en los distintos sistemas los biopolímeros están concentrados juntos en una fase inferior (*d*) o en diferentes fases (*a*).

Todos los sistemas descriptos de soluciones mixtas (estados estables o de fases separadas) difieren en estructura y propiedades, por lo tanto también variarán las propiedades funcionales de los sistemas de los que formen parte *(Tolstoguzov, 1986; Tolstoguzov, 1990; Tolstoguzov, 1991; Tolstoguzov, Grinberg & Gulov, 1985)*.

Entonces, como se vio en la **Figura 10**, las soluciones acuosas de mezclas de biopolímeros son susceptibles a la separación de fases por dos de los siguientes mecanismos: i) coacervación compleja o ii) incompatibilidad termodinámica.

i) Coacervación compleja.

Como lo definió originalmente *Bungenberg de Jong (1949)*, la coacervación compleja es una separación espontánea de un sistema en dos fases líquidas. La fase más concentrada en biopolímeros es el coacervado y la otra fase es la solución en equilibrio. La separación de fase asociativa de dos polímeros en agua ocurre si existe una atracción electrostática. La coacervación compleja es causada por la interacción de dos biopolímeros con cargas opuestas *(de Kruif, Weinbreck & de Vries, 2004)*, esto se origina en condiciones donde se favorece la atracción entre los dos tipos de macromoléculas. Esto es, a pH por debajo del pI de la proteína y a bajas fuerzas iónicas. La formación de estos complejos es usualmente reversible, dependiendo de la condiciones del medio.

Las interacciones atractivas no específicas se dan como resultado de múltiples interacciones químicas entre grupos laterales de los biopolímeros: iónicos, dipolares, van del Waals, puente hidrógeno, hidrofóbicas. Las atracciones más fuertes pueden ocurrir entre los grupos positivamente cargados de la proteína (pH < pI) y polisacáridos aniónicos, especialmente a bajas fuerzas iónicas, y las atracciones débiles se dan entre grupos no cargados o negativamente cargados de las proteínas (pH > pI) y polisacáridos *(Dickinson, 1993)*.

Durante la formación de complejos electrostáticos, la carga neta de los polisacáridos aniónicos va disminuyendo a medida que estos se complejan a los grupos polares de las proteínas. Esta disminución de carga neta opuesta reduce la hidrofilicidad y la solubilidad del complejo resultante. La formación de complejos solubles se da generalmente cuando la relación entra los reactivos está lejos de la necesaria para que las cargas opuestas sean equivalentes *(Baeza, 2003)*.

Las partículas dispersas de complejos no solubles se agregan y precipitan. La agregación de estos complejos en solución se da mediante uniones puente hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, interacciones dipolo–dipolo *(Baeza, 2003)*.

Existe una relación entre la formación de complejos con la composición, la estructura y las propiedades de los biopolímeros. Los biopolímeros se ponen en contacto durante el

complejamiento y forman zonas de unión que son regiones donde se juntan segmentos de dos o más moléculas de diferentes biopolímeros. La heterogeneidad de las zonas de unión en términos de tamaño y estabilidad se debe a diferencias en la estructura química, el tamaño y la forma de las cadenas que interactúan *(Tolstoguzov, 1993; Tolstoguzov, 1994)*.

El área de contacto entre moléculas de proteínas globulares está limitada por su topografía. La conformación rígida y compacta de las proteínas globulares restringe el número de grupos con cargas opuestas capaces de interactuar unos con otros. El número de posibles zonas de unión en proteínas esféricas como las globulares (por ejemplo, β–lg) es menor que para otras proteínas con estructuras más desordenadas y flexibles (por ejemplo, CMP o polisacáridos aniónicos lineales, como los PGA) *(Tolstoguzov, 1997)*.

Los principales usos de los complejos son como reemplazantes de grasa, debido a sus propiedades nutricionales y funcionales. Además se utilizan los complejos texturizados en forma de fibra para la obtención de análogos de carne bajos en grasa. Los complejos también se utilizan en la producción de films comestibles, que poseen ventajas respecto de films formados con un solo biopolímero *(Baeza, 2003)*.

ii) Incompatibilidad termodinámica.

Por el contrario, en el fenómeno de incompatibilidad termodinámica, existe una separación espontánea en dos fases también pero en este caso, una es predominantemente rica en proteína y la otra rica en polisacárido *(Tolstoguzov, 1991)*.

Generalmente, esta separación ocurre cuando la concentración total de los componentes macromoleculares excede el 4 % *(Tolstoguzov, 1986)*. Incluso a concentraciones totales del 1 %, se han observado fenómenos segregativos en algunas soluciones mixtas de polisacáridos y proteínas *(Doublier, Garnier, Renard & Sanchez, 2000)*.

La presencia de una interacción repulsiva desfavorable (endotérmica) entre segmentos químicamente diferentes de polímeros en solución conduce a una alta probabilidad de exclusión mutua de cada componente polimérico.

La incompatibilidad de los biopolímeros depende de la intensidad de las interacciones entre ellos, entre las moléculas de cada uno consigo mismas y con el solvente (diferencias en la hidrofilicidad de los biopolímeros) y se origina bajo ciertas condiciones las cuales inhiben la formación de complejos entre biopolímeros. A una concentración total de biopolímero

moderada, la separación del sistema en dos fases depende de la carga del biopolímero, del pH y la fuerza iónica *(Alves, Antonov & Goncalves, 1999)*. La incompatibilidad se favorece a alta fuerza iónica y/o a valores de pH mayores que el pI de la proteína.

Además la incompatibilidad puede aumentar por el efecto de otros factores: i) el aumento del peso molecular y la rigidez estructural de los biopolímeros; ii) la desnaturalización de proteínas globulares debido al incremento de la hidrofobicidad y al tamaño de las cadenas polipeptídicas agregadas; iii) el aumento de la concentración de sales y de la temperatura *(Tolstoguzov, 1997)*.

La estructura química de los polisacáridos es el factor que más afecta la incompatibilidad y la separación de fases en sistemas de proteínas y polisacáridos. La incompatibilidad disminuye en el siguiente orden: polisacáridos con grupos carboxilo > polisacáridos neutros > polisacáridos con grupos sulfato. Además, los polisacáridos lineales son más incompatibles con las proteínas que los polisacáridos ramificados *(Grinberg & Tolstoguzov, 1997)*. La incompatibilidad termodinámica también varía por la presencia de otros componentes como moléculas lipofílicas y moléculas de sacarosa, los cuales presentan en general un efecto negativo y positivo, respectivamente *(Semenova, 1996)*.

El comportamiento de incompatibilidad se representa en la **Figura 11**, donde se muestra el diagrama de fases *(Grinberg & Tolstoguzov, 1972; Grinberg & Tolstoguzov, 1997; Polyakov, Grinberg & Tolstoguzov, 1997; Tolstoguzov, 1997; Tolstoguzov, 2001; Tolstoguzov et al., 1985)*.

La curva en "negrita" es la curva binodal y marca el límite de cosolubilidad de los biopolímeros. Cuando la composición del sistema, respecto a los dos biopolímeros, se encuentra por debajo de la curva binodal, el sistema permanece como una fase simple homogénea (sistema *b* de la **Figura 10**). En cambio, cuando la composición de un sistema se encuentra por encima de la curva binodal, es inestable y se separa en dos fases líquidas, una rica en proteína y la otra en polisacárido (sistema *a* de la **Figura 10**) *(Dickinson & McClements, 1995; Tolstoguzov, 1997; Tolstoguzov, 2003)*.

La curva binodal se obtiene mediante la determinación de la concentración de cada componente en ambas fases luego de centrifugar el sistema mixto, por lo tanto se define un diagrama de fase para cada sistema particular.

En la **Figura 11** al mezclar soluciones A y B en una proporción de volumen BC/AC, se obtiene una mezcla de composición C. Este sistema mixto C se separa en dos fases D y E. Los puntos D y E son los puntos binodales. Las ramas binodales están bastante cerca de los ejes, si bien no coinciden con los ejes de concentración de los biopolímeros. Esto significa que los biopolímeros tienen limitada cosolubilidad en el solvente y que cada biopolímero se concentra en fases diferentes. Las composiciones de D y E se pueden obtener por sedimentación y análisis posterior del contenido de polisacárido y proteína.

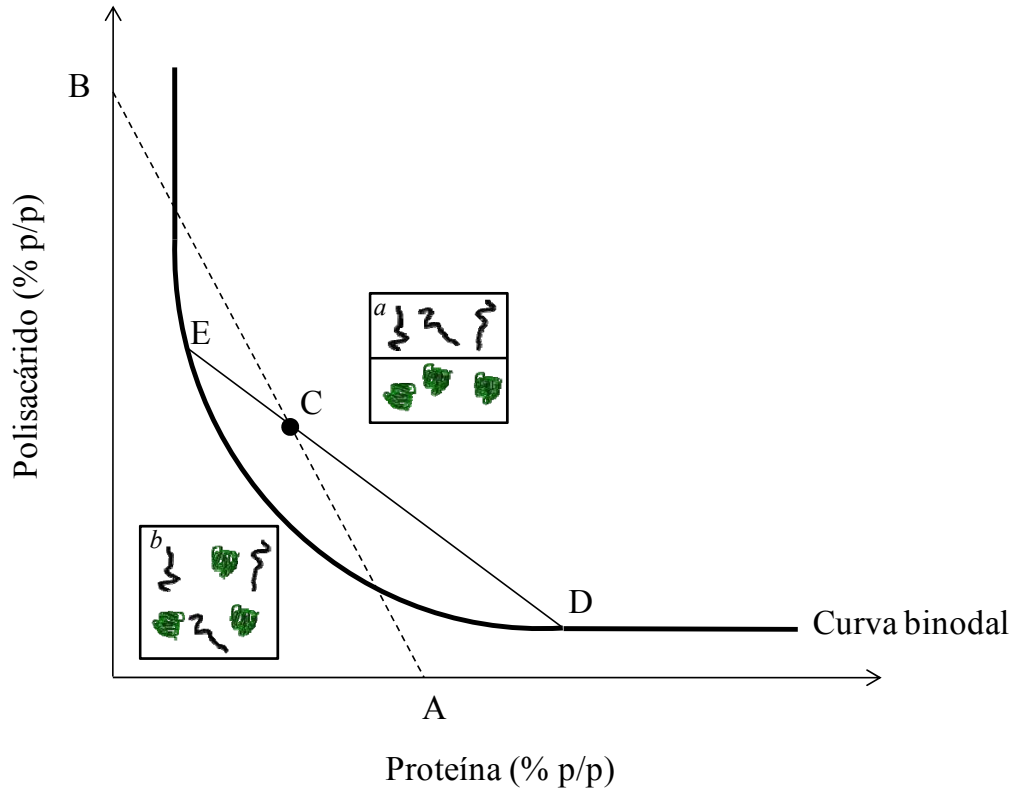


Figura 11. Representación esquemática de un diagrama de fase típico de una solución acuosa de proteína y polisacárido mostrando la posición de la curva binodal. Se incluye el comportamiento (descripto en la **Figura 10**) de los sistemas por debajo y por encima de la curva binodal.

Se han reportado un gran cantidad de diagramas de fases para sistemas mixtos de proteínas y polisacáridos *(Grinberg & Tolstoguzov, 1997; Tolstoguzov, 1997)*. Las diferencias en volúmenes de exclusión entre los biopolímeros incompatibles afecta el resultado de la competencia entre los biopolímeros en el seno de la fase. Esta competencia entre los biopolímeros o un fenómeno de exclusión mutua entre las macromoléculas contribuye a la asimetría de los diagramas de fase en sistemas de proteínas y polisacáridos *(Tolstoguzov,*

1997). El grado de asimetría de los diagramas de fase refleja una mayor hidrofilicidad y un volumen efectivo superior de los polisacáridos (especialmente para los lineales) comparado con las moléculas compactas de proteínas globulares. De acuerdo a esto, una fase menos concentrada rica en polisacárido se encuentra en equilibrio con una fase más concentrada rica en proteína. En muchos casos, la concentración de proteína se ve aumentada de modo que esta gelifica.

3.3. Técnicas para la caracterización de las interacciones proteína–proteína o proteína–polisacárido en solución.

Existen numerosas técnicas para evaluar la presencia de interacciones proteína–proteína o proteína–polisacárido en solución. Entre ellas se pueden mencionar: cromatografía, espectroscopía, microscopía, calorimetría diferencial de barrido, técnicas de dispersión de luz, etc. Muchas de estas técnicas han avanzado en precisión y calidad de resultados. Entre ellas se encuentran las técnicas de dispersión de luz que brindan gran cantidad de información para evaluar y caracterizar dichas interacciones.

La técnica de dispersión dinámica de luz láser (DLS, por sus siglas en inglés: dynamic light scattering) proporciona información cuantitativa y cualitativa de los agregados. Esta técnica permite conocer el coeficiente de difusión y el grado de asociación/agregación de una proteína en solución *(Jachimska, Wasilewska & Adamczyk, 2008)*, los cuales están relacionados con la concentración de proteína y las condiciones del medio como pH, fuerza iónica y temperatura.

Debido a la dependencia del tamaño de partícula con la intensidad de dispersión de luz, la agregación de proteínas desnaturalizadas o la asociación de diferentes biopolímeros se pueden monitorear fácilmente por medio de instrumentos de dispersión de luz. Por este motivo en este trabajo, para la caracterización de interacciones en solución se seleccionó esta técnica con el objetivo de evaluar el efecto de las condiciones del medio sobre el estado de asociación, la agregación o el autoensamblaje de las moléculas en estudio.

La intensidad de dispersión de luz de una molécula es proporcional al cuadrado del peso molecular. Por lo tanto, esta técnica es muy sensible a la aparición de formas asociadas o agregadas de las proteínas; por la misma razón esta técnica es muy sensible también a las impurezas, aún a bajas concentraciones. DLS también permite determinar las poblaciones existentes en una muestra con múltiples tamaños de partículas.

Una de las ventajas más importantes de esta técnica es el hecho de que es un método no invasivo, por lo tanto se puede analizar cómo es afectada una misma muestra ante diferentes efectos y además se requiere un volumen muy pequeño de muestra.

Como se dijo anteriormente, la estructura cuaternaria de una proteína puede verse influenciada por las propiedades de una solución como pH y fuerza iónica. La precisión de las mediciones por DLS es suficiente para distinguir cambios en la estructura cuaternaria de una proteína *(Malvern-Instruments)*.
Durante la formulación de productos se puede producir un cambio importante en la densidad de carga superficial y en la fuerza iónica de una solución. Pequeñas variaciones en alguno de estos parámetros pueden significar la diferencia entre una formulación estable o una muestra agregada. Debido a su sensibilidad, DLS es una herramienta útil para monitorear el efecto de la formulación de este tipo de productos sobre la agregación de proteínas.

En la **Figura 12** se muestra un esquema del mecanismo del equipo de DLS. La fuente de luz láser incide sobre las partículas de la muestra que dispersan la luz en diferentes direcciones y esta luz dispersada es registrada por un detector óptico. La intensidad de dispersión fluctúa de acuerdo al movimiento Browniano que es el movimiento aleatorio de las partículas en el solvente.

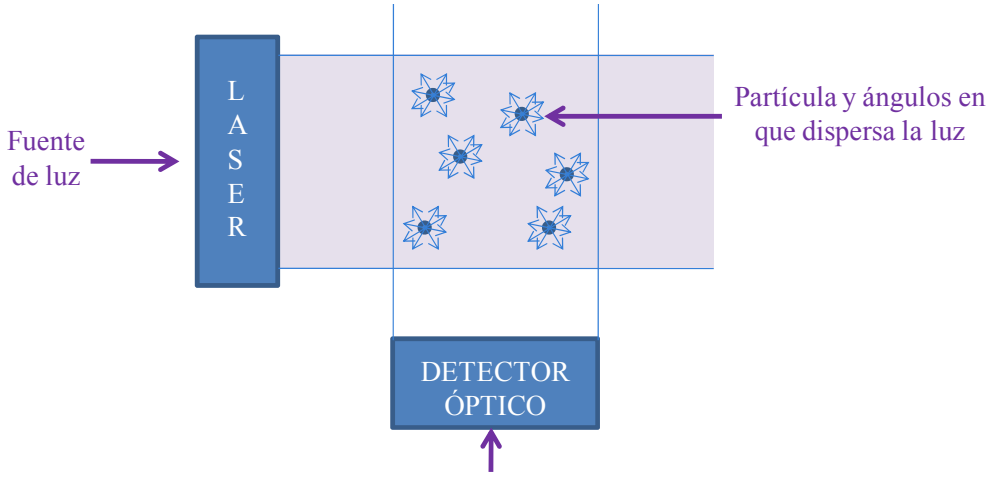


Figura 12. Representación esquemática del equipo de dispersión dinámica de luz. Adaptado de *Mattison, Morfesis & Kaszuba (2003)*.

El análisis de la intensidad de estas fluctuaciones permite estimar el coeficiente de difusión translacional (*D*) de la partícula que se relaciona con el tamaño de la misma mediante la ecuación de Stokes–Einstein: $d(H) = kT/3\pi\eta D$, donde *d(H)*: diámetro hidrodinámico (m); *D*: coeficiente de difusión translacional ($m^2.s^{-1}$); *k*: constante de Boltzmann (1,38 x 10^{-23} $N.m.K^{-1}$); *T*: temperatura absoluta (K); η: viscosidad ($N.s.m^{-2}$).

Las partículas pequeñas se mueven rápidamente y las partículas grandes se mueven más lentamente. A partir de dicha relación se obtienen los gráficos de distribución de tamaño de partícula como se muestra en la **Figura 13**.

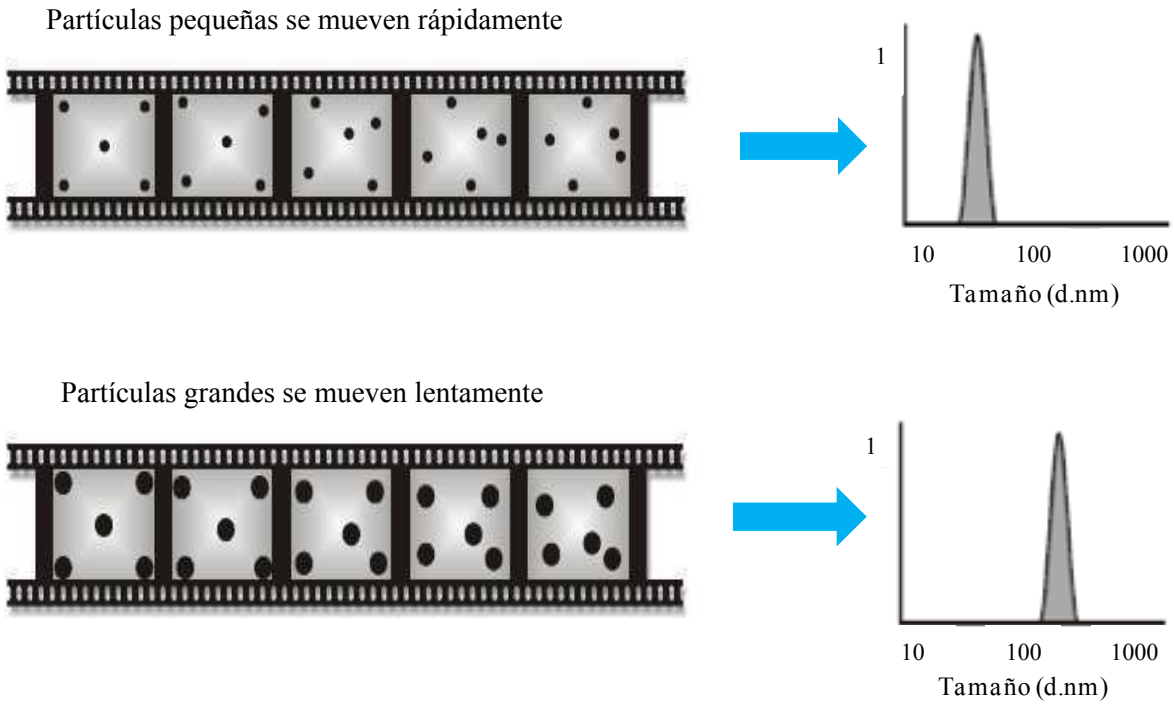


Figura 13. Representación esquemática de las distribuciones a las que dan origen partículas de diferentes tamaños.

4. Coloides alimentarios.

En este trabajo se estudiarán las interacciones CMP–β–lg y de ellas con polisacárido en diferentes coloides alimentarios. En primer lugar se evaluará el comportamiento de dichos biopolímeros solos y sus mezclas en solución, y luego se determinará el efecto de dichas

interacciones en sistemas gelificados y en interfases aire–agua. Por eso, a continuación se describirá el proceso de gelificación y de formación de interfases.

4.1. Gelificación.

Una de las propiedades funcionales más importantes de las proteínas que puede ser inducida por tratamiento térmico es la gelificación. Las características típicas de muchos alimentos están determinadas por la propiedad de gelificar de las proteínas durante el calentamiento. Por ejemplo, la textura, propiedades organolépticas, rendimiento y calidad de productos como frankfurters, quesos, yogurt, tofu, huevo duro, postres de gelatina, están vinculadas a la formación de un gel proteico *(Pilosof, 2000)*.

Sin embargo, la gelificación proteica también puede ser promovida por otro tipo de condiciones como cambios en el pH, presencia de sales (por ejemplo adición de iones Ca^{+2} en micelas de caseína), hidrólisis enzimática moderada, altas presiones, etc.

La gelificación puede ser definida como un fenómeno de agregación ordenada en el cual fuerzas atractivas y repulsivas están balanceadas de modo de obtener una matriz o red proteica capaz de retener una gran cantidad de agua *(Hermansson, 1979)*.

4.1.1. Técnicas de gelificación.

La gelificación involucra el calentamiento a distintas temperaturas y distintos tiempos de dispersiones proteicas de concentración apropiada. Las condiciones de temperatura y tiempo a utilizar son propias de cada proteína y estarán determinadas en función de la temperatura de desnaturalización de la misma en las condiciones del ensayo. La gelificación puede ocurrir durante el calentamiento (proteínas de soja, clara de huevo, proteínas de lactosuero) o luego del enfriamiento (gelatina, lisozima) dependiendo de la proteína y condiciones de gelificación.

La concentración de proteína es uno de los factores más importantes que determinan las características finales de los geles. La mayoría de las proteínas exhiben una concentración mínima por debajo de la cual no gelifican, a esta concentración se la denomina “concentración crítica”. El tipo y las propiedades de los geles se ven afectados por el pH, tipo y concentración de sales, azúcares y otros componentes como lípidos y polisacáridos *(Pilosof, 2000)*.

4.1.2. Gelificación por calor de proteínas globulares.

La **Figura 14** muestra un esquema del proceso de gelificación para proteínas globulares. Se pueden caracterizar varias etapas *(Foegeding & Hamann, 1992)*:

i) La proteína se desnaturaliza por acción del calor.

ii) Las moléculas proteicas desnaturalizadas interaccionan entre sí generando agregados.

iii) Luego de un cierto tiempo se llega al "punto gel" donde la interacción entre agregados es suficientemente importante como para generar una matriz primaria que exhibe propiedades de sólido viscoelástico. Estas propiedades pueden ir cambiando con el tiempo y con el enfriamiento hasta formar la matriz de equilibrio o sea la estructura final del gel.

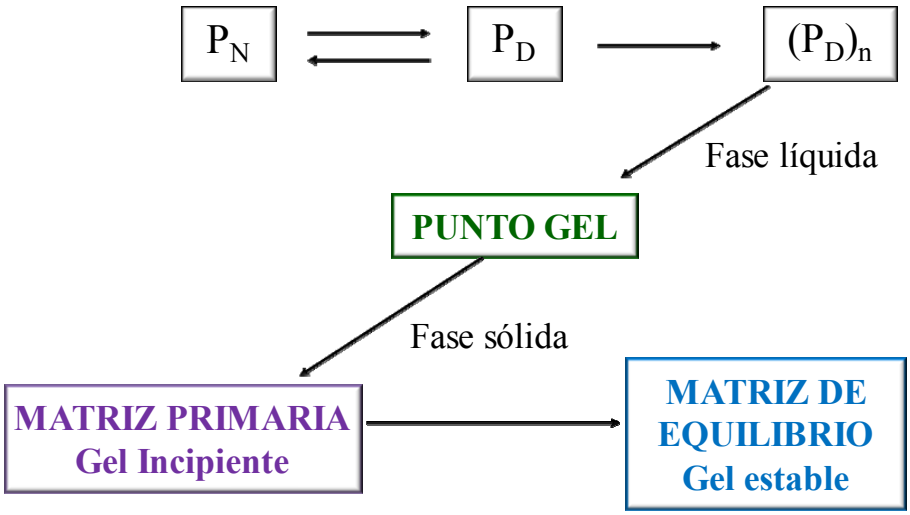


Figura 14. Esquema del proceso de gelificación, involucrando la desnaturalización y la agregación proteicas.

Existen básicamente dos teorías para describir la gelificación: la teoría de *Flory–Stockmayer (1953; 1974)*, y la teoría de la percolación atribuida a *De Gennes (1979)*. Según el modelo de Flory–Stockmayer, la gelificación es un evento súbito que ocurre cuando es alcanzado un cierto grado de entrecruzamiento entre el polímero, valor crítico llamado punto gel, en el cual la viscosidad diverge a infinito. En la teoría de la percolación se asume que los monómeros

forman agregados pequeños y que en un cierto punto se llega al punto gel en el cual los agregados se entrecruzan.

El proceso mostrado en la **Figura 14** puede ser visto desde el punto de vista reológico como el pasaje de una solución (sol) que va aumentando su viscosidad mientras se forman los agregados proteicos, a la formación de un sólido viscoelástico (gel) *(Baeza, 2003)*.

La desnaturalización de las proteínas del suero se puede describir como un proceso de dos etapas: i) un desplegamiento de la molécula de proteína, el cual puede ser reversible o irreversible, y ii) una agregación irreversible *(de Wit & Klarenbeek, 1984; Mulvihill & Donovan, 1987)*.
El mecanismo aceptado clásicamente para describir la desnaturalización y agregación de proteínas globulares es el siguiente *(Morr & Ha, 1993)*:

$$(P_N)_n \longleftrightarrow nP_N \longrightarrow nP_D \qquad (1)$$

$$nP_D \longrightarrow (P_D)_n \qquad (2)$$

Donde P_N es la proteína nativa, P_D es la proteína desnaturalizada y n es un número pequeño de subunidades o monómeros de proteína.
Las reacciones iniciales (1) de este proceso implican un debilitamiento y ruptura de uniones disulfuro e hidrógeno, de modo de alterar la conformación nativa de la proteína y disociar agregados proteicos.
La segunda etapa (2) (si el tiempo de calentamiento y la concentración de proteína son suficientes) es una polimerización de moléculas de proteína disociadas y desplegadas para producir una estructura tridimensional (gel) mediante la formación de enlaces intermoleculares de tipo disulfuro, hidrofóbicos o electrostáticos *(Mangino, 1992; Morr & Ha, 1993)*.

Si bien el estado gelificado final está formado por agregados de proteína principalmente desnaturalizada, $(P_D)_n$, no se sabe ciertamente cuál de las siguientes reacciones está implicada:

$$nP_N \longleftrightarrow (P_N)_n \longrightarrow (P_D)_n \qquad (3)$$

$$nP_N \longleftrightarrow nP_D \longrightarrow (P_D)_n \qquad (4)$$

Según se produzca una u otra reacción el tipo de uniones que forman los agregados y el tamaño y forma de los mismos será diferente, produciendo así diferentes tipos de geles.

La reacción (3) se da en condiciones que favorecen las interacciones proteína–proteína en solución. Estas condiciones pueden ser pH cercano al pI de la proteína, presencia de una considerable concentración de sales, o a bajas temperaturas de calentamiento *(Verheul et al., 1999)*. Este tipo de reacción puede dar lugar a la formación de agregados de proteína previamente a la desnaturalización *(Baeza, 2003; Stading & Hermansson, 1990)* y luego se dará la desnaturalización de los agregados formados.

La reacción (4) se da por calentamiento en condiciones más favorables a la desnaturalización o desdoblamiento de la proteína que a la agregación de la misma (pH por encima del pI de la proteína, fuerzas iónicas débiles, presencia de ciertos iones, presencia de agentes disociantes como la urea o detergentes, altas temperaturas de calentamiento). En estas condiciones, durante el calentamiento se liberan los grupos tiol internos y se promueve la formación o intercambio de uniones disulfuro entre moléculas vecinas, lo que lleva a la formación de agregados lineales. El calentamiento además favorece las interacciones hidrofóbicas ya que también se activan grupos hidrófobos antes ocultos en el interior de la molécula proteica. La formación de la red tridimensional final implica también enlaces puente hidrógeno que se favorecen durante el enfriamiento.

Además desde el punto de vista microestructural los geles se pueden clasificar en geles formados por una red de filamentos finos y geles agregados o particulados *(Pilosof, 2000)*.

El hecho de que se forme uno u otro tipo de gel se relaciona con que las condiciones mencionadas anteriormente den lugar a la reacción (4) y (3), respectivamente. Así, los geles de filamentos finos están formados por una asociación ordenada de moléculas de proteína y el grosor de los filamentos es muy pequeño de tal forma que estos geles son transparentes. Mientras que los geles agregados se forman a partir de una agregación desordenada, son opacos y tienen menor capacidad de retención de agua.

Las diferencias en las interacciones moleculares y en el equilibrio de las fuerzas atractivas y repulsivas dependientes de las condiciones del medio mencionadas anteriormente se reflejan en la apariencia macroscópica de los geles de proteínas globulares.
En la **Figura 15** se muestra un esquema de los dos tipos de geles mencionados anteriormente.

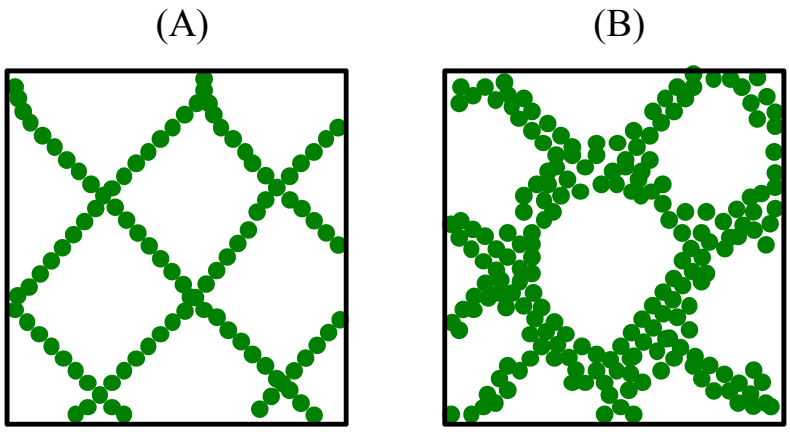


Figura 15. Esquema de los diferentes tipos de microestructura de geles de proteínas globulares: (A) de filamentos finos, (B) geles agregados o particulados (adaptado de *Pilosof (2000)*).

Todo lo mencionado hasta aquí respecto al proceso de gelificación está definido por la interacción proteína–proteína; sin embargo, los geles de proteínas pueden formarse también en presencia de otros biopolímeros como polisacáridos, sean ellos gelificantes o no gelificantes. Este fenómeno está dado a partir de ciertos tipos de interacciones proteína–polisacárido mencionadas en el apartado **3.2** de esta introducción y **Figura 10**.

La mayoría de los estudios de gelificación de mezclas de proteínas y polisacáridos se dan en condiciones de incompatibilidad termodinámica *(Beaulieu, Turgeon & Doublier, 2001; Fernandes, 1994; Ndi, Swanson, Barbosa-Canovas & Luedecke, 1996; Syrbe, Fernandes, Dannenberg, Bauer & Klostermeyer, 1995; Turgeon & Beaulieu, 2001; Walkenstrom, Panighetti, Windhab & Hermansson, 1998; Zasypkin, Dumay & Cheftel, 1996)*.
La presencia de polisacáridos en estos sistemas se pone en evidencia de diferentes formas: disminución de la concentración de proteína mínima necesaria para gelificar o concentración crítica *(Ndi et al., 1996; Turgeon & Beaulieu, 2001; Zasypkin et al., 1996)*, disminución de la temperatura o tiempo de gelificación respecto a los geles de proteína sola *(Bryant &*

McClements, 2000), modificación en la textura de los geles obtenidos *(Olsson, Langton & Hermansson, 2002a; Zasypkin et al., 1996)*, cambios en la microestructura del gel (geles particulados o filamentos finos) *(Olsson, Langton & Hermansson, 2002b; Zasypkin et al., 1996)*, modificación de la apariencia y de la capacidad de retención de agua de los geles *(Beaulieu et al., 2001; Olsson et al., 2002a)*.

En presencia de polisacáridos no–gelificantes se obtienen geles en los cuales el polisacárido se encuentra disperso en la fase acuosa de la matriz gelificada de proteína o en forma de relleno *(Baeza, 2003)*.
Aún sin que se produzca una separación macroscópica de fases, la existencia de interacciones repulsivas entre proteína y polisacárido puede producir importantes efectos en la cinética de gelificación de uno o ambos componentes, así como en la microestructura y reología del gel resultante *(Dickinson, 1993)*.

4.1.3. Caracterización del proceso de gelificación.

La esencia del proceso de gelificación es sin duda el punto gel, es decir el punto donde ocurre la transformación de líquido a sólido. Esto indica que las propiedades que caracterizan esta transición son fundamentalmente mecánicas. Pero el método para determinarlas debe cumplir ciertos requerimientos: la medición debe ser muy rápida, no debe perturbar el sistema fuera del rango de la respuesta lineal, debe proveer magnitudes físicas objetivas e indicadoras de las características de la red formada y con una base teórica *(Pilosof, 2000)*.
Estos requerimientos eliminan a los métodos transientes como las mediciones de “creep” o de relajación del esfuerzo, quedando solamente los métodos reológicos dinámicos en los cuales se aplica un esfuerzo o deformación oscilatoria como la única alternativa de seguimiento de la gelificación *(Pilosof, 2000)*; dichos métodos son los que utilizaremos en el presente trabajo.

4.2. Interfases.

4.2.1. Sustancias tensioactivas.

Los tensioactivos (o surfactantes) son sustancias con actividad superficial debido a que sus

moléculas son anfifílicas (tienen una parte polar y otra no polar). Para minimizar la energía libre, las moléculas de tensioactivo tienden a orientarse en la interfase aceite–agua o aire–agua, de forma que los grupos hidrofílicos estén localizados en la fase acuosa y la parte hidrófoba (lipófila) en la fase oleosa o gaseosa, respectivamente *(McClements, 2005; Rodríguez Patino, de la Fuente Feria & Gómez Herrera, 1990)*.

Existen dos clases de moléculas tensioactivas que pueden estabilizar espumas y emulsiones *(Wilde, 2000)*:

(i) Surfactantes o tensioactivos de bajo peso molecular: detergentes, fosfolípidos y lípidos. Son solubles en agua o aceite, y normalmente forman una película compacta con baja tensión interfacial.

(ii) Biopolímeros: macromoléculas anfifílicas, las más usadas son las proteínas, aunque también incluye algunos polisacáridos. Estos polímeros forman una película viscoelástica irreversible.

Ambos grupos de sustancias tensioactivas suelen coexistir en la película interfacial presentando funciones específicas en el procesado y las propiedades del producto final. El empleo óptimo de ellas depende del conocimiento que se tenga de sus propiedades fisicoquímicas interfaciales (actividad interfacial, cantidad adsorbida, estructura, espesor, topografía, estabilidad, movilidad lateral, interacciones entre las moléculas adsorbidas, capacidad de cambiar la conformación, propiedades reológicas interfaciales, etc.). También es importante conocer la cinética de formación de la película y otras propiedades fisicoquímicas en las interfases fluidas.

4.2.2. Concepto de tensión superficial/interfacial.

Imaginemos una molécula situada en el interior de un líquido, suficientemente alejada de la superficie libre del mismo como para que su esfera de acción molecular se encuentre completamente en el interior del líquido. Todas las moléculas contenidas en dicha esfera ejercerán fuerzas de atracción sobre ésta y, como consecuencia de la homogeneidad isótropa del líquido, la distribución de fuerzas también será isótropa y su resultante nula. Supongamos ahora, que una molécula está situada muy cerca de la superficie libre del líquido, más cerca que la esfera de acción molecular; en estas condiciones, habrá más moléculas atrayéndola

hacia el interior del líquido que hacia fuera del mismo. La distribución anisótropa de fuerzas de atracción intermoleculares sobre estas moléculas próximas a la superficie libre resulta en una fuerza neta sobre las mismas, dirigida hacia el interior del líquido y que será tanto más intensa, como más cercana a la superficie libre se encuentre la molécula en cuestión *(Maldonado Valderrama, 2006)* **(Figura 16)**.

Esta fuerza atractiva neta que dirige las moléculas hacia el seno de la fase en que se encuentra, provoca una reducción del área interfacial. Esta fuerza se denomina tensión interfacial o superficial, la unidad en el SI es $J/m^2 = N/m$.

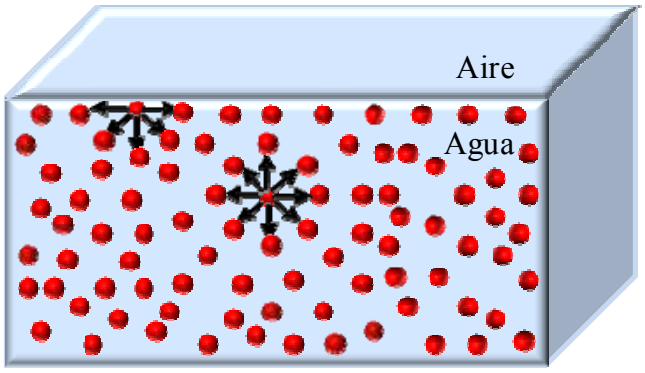


Figura 16. Interacciones entre las moléculas de un líquido.

La termodinámica clásica define la tensión superficial (σ) como el trabajo (W) que es necesario realizar para incrementar en una unidad el área interfacial (A) *(Dickinson & Stainsby, 1982; McClements, 1999b)*. Este trabajo representa la variación de energía libre que sufre el sistema como consecuencia de un aumento de la superficie según: $W = \sigma \ \Delta A$.

El valor de la tensión superficial da idea de lo difícil que puede resultar la fabricación de una espuma o una emulsión y cuán estable será ésta. Cuanto mayor sea la tensión superficial, mayor trabajo tendrá que aportar al sistema para aumentar el área interfacial. La adición de tensioactivos reduce la tensión superficial del sistema, por lo que facilita en gran medida la formación de la espuma o emulsión *(Bos & Van Vliet, 2001)*.

4.2.3. Cinética de adsorción en la interfase.

La cinética de adsorción de un biopolímero (proteína o polisacárido) en la interfase aire–agua (o aceite–agua) se refiere a cambios de presión superficial con el tiempo.

La presión superficial se define como $\pi = \sigma - \sigma_0$, donde σ_0 es la tensión superficial de la disolución acuosa, y σ es el valor de la tensión superficial en presencia de la proteína y/o el polisacárido.

Las principales etapas de la cinética de adsorción son las siguientes *(Graham & Philips, 1979; MacRitchie, 1978; MacRitchie, 1990; Tornberg, 1978a)* (**Figura 17**): (i) difusión de la proteína desde el seno de la fase acuosa hacia la interfase aire–agua; (ii) adsorción (penetración) y desplegamiento interfacial; y (iii) agregación (reordenamiento) en la interfase aire–agua, formación de multicapas e incluso gelificación interfacial.

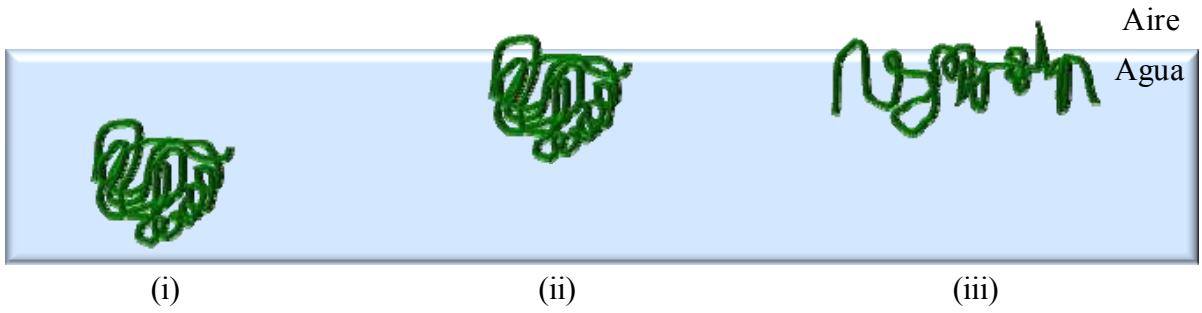


Figura 17. Procesos de adsorción: (i) difusión de la proteína hacia la interfase; (ii) penetración de la proteína en la interfase; (iii) reordenamiento de la proteína en la interfase.

La cinética de adsorción de la proteína está inicialmente controlada por la difusión, pero a tiempos mayores, la penetración y el reordenamiento de la proteína en la película interfacial serán los que controlen el proceso.

Toda sustancia tensioactiva tiende a acumularse en la interfase formando películas monomoleculares que se denominan *monocapas.*

Los tensioactivos de bajo peso molecular forman monocapas con un alto grado de empaquetamiento en la interfase, lo que los hace muy efectivos en reducir la tensión interfacial (**Figura 18i**).

Los biopolímeros flexibles, tales como las caseínas, se ubican en la interfase en una forma expandida, con segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos incluidos en la fase aire y agua respectivamente en forma de lazos y colas (**Figura 18ii**).

Las sustancias tensioactivas de alto peso molecular con estructura compacta (tales como las proteínas globulares) pueden cambiar considerablemente su conformación en la interfase inmediatamente después de la adsorción *(Bos & Van Vliet, 2001)*. Tales cambios

conformacionales pueden ser vistos como una desnaturalización interfacial de la proteína en la que sus residuos hidrofóbicos se orientan hacia la fase aire y los hidrofílicos hacia la acuosa *(Dalgleish, 1996)* (**Figura 18iii**). Además, las moléculas de proteína también pueden cambiar su conformación, luego de la adsorción, en respuesta a las condiciones del medio como pH, fuerza iónica, temperatura y composición de la subfase acuosa *(Damodaran, 1996; McClements, 1999a)*. La velocidad a la que la conformación de una proteína cambia en la interfase depende de su estructura molecular *(Dickinson, 1992a)*. Las moléculas más flexibles pueden alterar rápidamente su conformación, mientras que las moléculas más rígidas, de conformación globular, cambian más lentamente.

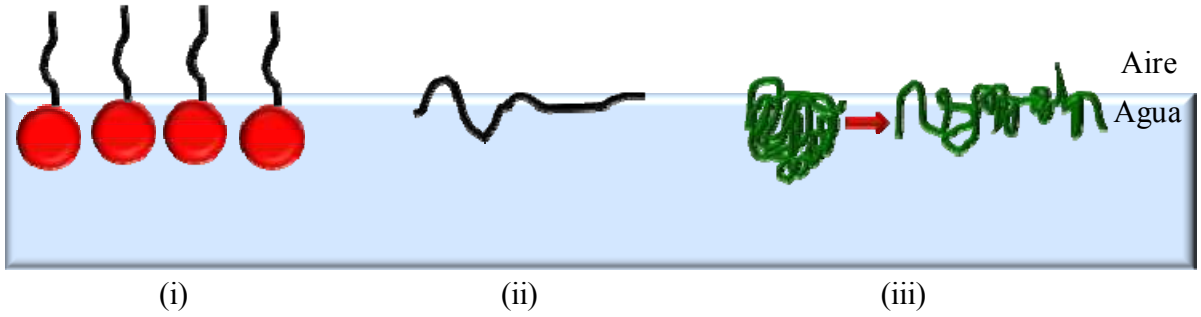


Figura 18. Conformación de moléculas tensioactivas en interfases aire–agua (o aceite–agua): (i): tensioactivos de bajo peso molecular, (ii): biopolímeros flexibles y (iii): proteínas globulares. Adaptado de *Bos & Van Vliet (2001)*.

Como se dijo anteriormente, es muy importante conocer la velocidad a la que ocurre el proceso de adsorción en la interfase. La velocidad de adsorción depende de las características moleculares de la sustancia tensioactiva (tamaño, conformación e interacciones), la naturaleza de la fase continua y de las condiciones del proceso, tales como temperatura, método de formación de la dispersión, etc. Dicha velocidad debe ser suficientemente rápida como para que las moléculas puedan adsorberse sobre la interfase de burbujas o gotas creadas durante la formación de la espuma o emulsión.

En resumen, las características más importantes que debe reunir una sustancia tensioactiva son: (i) la capacidad para reducir la tensión interfacial y la tasa de reducción, (ii) el grado de adsorción en la interfase, (iii) su capacidad de desorción, (iv) la posibilidad de cambiar su conformación durante y después de la adsorción, (v) el espesor de la monocapa adsorbida y su

resistencia, y (vi) las interacciones entre las moléculas adsorbidas *(Bos & Van Vliet, 2001; Dickinson & McClements, 1995; Kim & Kinsella, 1985; Walstra, 1996)*.

La investigación sobre la cinética de adsorción de las proteínas, que es esencial para el conocimiento y control de procesos dinámicos entre los que se incluyen la formación de las emulsiones y espumas alimentarias, ha motivado el desarrollo de un gran número de métodos para determinar las velocidades de adsorción *(Andrade, 1985; Brash, 1981)*.
La adsorción de proteínas es el resultado neto de varias interacciones entre y con los componentes del sistema, que incluye la interfase (gas, líquida o sólida), las moléculas de proteína, las del disolvente (agua) y cualquier otro soluto. El origen de estas interacciones incluye a las fuerzas de London, de van der Waals (fuerzas de dispersión, orientación e inducción), fuerzas ácido–base de Lewis (incluyendo las uniones puente hidrógeno), las fuerzas electrostáticas, los efectos estéricos, tales como el efecto hidrofóbico y las restricciones de empaquetamiento interno (estéricas y exclusión de volumen) *(McClements, 2005)*. Es decir, todas las interacciones intermoleculares tanto entre proteína–interfase, como entre disolvente–interfase o disolvente–disolvente son de importancia para la adsorción de la proteína *(Haynes & Norde, 1994; Norde & Lyklema, 1991)*.

La evidencia experimental y los modelados teóricos indican que sólo una fracción de los segmentos de una molécula de polímero adsorbida está en contacto directo con la interfase.
Como se muestra en la **Figura 19**, la configuración de una macromolécula (por ejemplo proteína) adsorbida en la interfase aire–agua se puede dividir en tres diferentes tipos *(Dickinson, 1992b)*:
(i) Fila (train): se refiere a los segmentos de la molécula que están en contacto directo con la interfase.
(ii) Lazo (loop): hace referencia a los segmentos de la molécula que están suspendidos en el seno de la fase.
(iii) Cola (tail): refiere a los segmentos terminales de la macromolécula. Frecuentemente estos segmentos están inmersos en la fase acuosa, debido a que suelen ser grupos N–R y C–R, que quedan cargados a pH neutro.

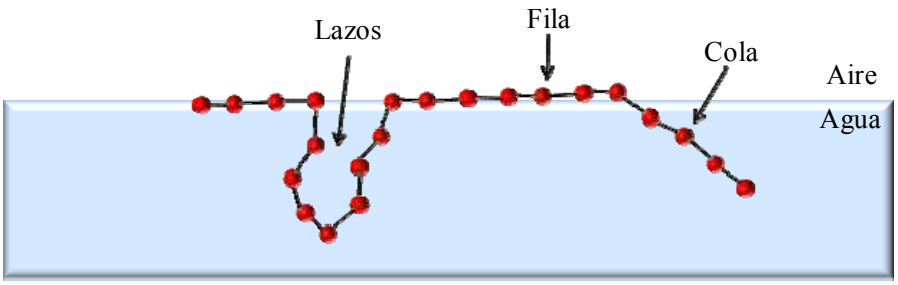


Figura 19. Representación esquemática de las diferentes conformaciones de una macromolécula en la interfase aire–agua. Adaptado de *Dickinson (1992b)*.

El hecho de que las macromoléculas adquieran una u otra conformación en la interfase depende de la flexibilidad de la cadena y de su afinidad con el medio *(Kim, 1985)*.

Una diferencia importante entre la adsorción de una macromolécula y de un surfactante de bajo peso molecular, es que el primero sólo tiene entre 30 – 40 % del área superficial disponible ocupada por segmentos en fila, en comparación con cerca de un 100 % para la monocapa de surfactante de bajo peso molecular (**Figura 18i**).

En un sistema acuoso no agitado, inicialmente, la molécula de proteína hidratada difunde rápidamente a la interfase y el proceso de adsorción está controlado por la difusión, dependiendo la velocidad de difusión del tamaño y la forma molecular y de la posibilidad de que la misma se adsorba al colisionar con la interfase (dependiente de la hidrofobicidad y del impedimento electrostático) *(Tornberg, 1978c)*.

La superficie de la película se encuentra en continua formación, y para cubrir el área máxima, las moléculas que arriban a la interfase se despliegan y se desnaturalizan parcialmente. El grado de desplegamiento de las proteínas globulares durante la adsorción depende de numerosos factores: la estabilidad conformacional y la flexibilidad de la molécula de proteína, la concentración de la solución, el tipo de interfase, etc. *(Dickinson, 1992b; Wilde & Clark, 1996)*.

El reordenamiento de las moléculas adsorbidas en la superficie puede ser retardado por varios eventos: presencia de una barrera de adsorción, lentos reordenamientos moleculares, formación de complejos, transiciones de fase en la superficie y formación o destrucción de una estructura tridimensional *(Lucassen-Reynders, 1993)*.

Cuando la concentración de la proteína adsorbida (Γ) aumenta, se genera una barrera electrostática sobre el lado acuoso de la superficie debido a la orientación preferencial de los grupos proteicos cargados hacia la fase acuosa polar. Las moléculas proteicas requieren entonces una energía cinética adecuada para superar la barrera electrostática (que involucra fuerzas repulsivas, impedimentos estéricos y osmóticos) y también requieren comprimir las moléculas ya adsorbidas en la interfase, para permitir la adsorción de proteína adicional. En esta etapa del proceso, la velocidad está determinada por la capacidad de las moléculas proteicas para penetrar en la interfase y reacomodarse, creando espacio en la película preexistente. Una vez adsorbidas en la interfase, las moléculas proteicas interactúan en la misma, para lograr un estado de menor energía libre *(Phillips, Whitehead & Kinsella, 1994b)*. Con el aumento de la cantidad de proteína adsorbida, el reordenamiento de las moléculas en forma extendida disminuye y la película cambia de estado expandido a comprimido *(Kinsella & Phillips, 1989)*.

En conclusión, se puede decir que las proteínas tienen gran potencial como sustancias tensioactivas para emplearlas en la obtención de espumas o emulsiones.

Las proteínas, a diferencia de los tensioactivos de bajo peso molecular como mono o diglicéridos o fosfolípidos, poseen flexibilidad molecular y capacidad de alterar su conformación para reorientarse y asociarse en la interfase *(Phillips et al., 1994b)*. Además de reducir la tensión interfacial, pueden formar una película continua sobre la interfase por medio de complejas interacciones intermoleculares, confiriéndole una estructura deseable a la interfase. El desarrollo de esta película interfacial, con elevada resistencia mecánica, puede no ser factible en el caso de tensioactivos de bajo peso molecular debido a que las interacciones intermoleculares son más débiles *(Rodríguez Patino, Rodríguez Niño, Carrera Sánchez, Cejudo Fernández, Navarro García & Rodríguez Mateos, 2000)*.

Sin embargo, existen diferentes factores (intrínsecos y extrínsecos) que afectan las propiedades interfaciales de las proteínas y que, por lo tanto, se deben tener en cuenta al momento de elegir una proteína como agente tensioactivo. Entre los factores intrínsecos se encuentran: la composición de aminoácidos, la relación de aminoácidos no polares y polares, la distribución de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, la presencia de uniones disulfuro y grupos tioles libres y el tamaño, forma y flexibilidad molecular. Entre los extrínsecos se pueden nombrar: el pH y la fuerza iónica del

medio, la concentración de proteína, el tiempo y la temperatura a la que se expone la proteína en la interfase y la aplicación de energía mecánica *(Baeza, 2003)*.

4.2.4. Adsorción competitiva en mezclas de diferentes moléculas tensioactivas.

Como se dijo anteriormente, los dos tipos de moléculas que tienen una fuerte tendencia a adsorberse son las proteínas y los tensioactivos de bajo peso molecular (por ejemplo, lípidos y sus derivados).
En la práctica, la formación de una película estable en espumas y emulsiones alimentarias que contienen ambos tipos de moléculas dependerá de *(Dickinson, 1992b; Dickinson, Narham & Stainsby, 1989)*:
(i) la adsorción competitiva entre proteínas y tensioactivos de bajo peso molecular
(ii) la adsorción competitiva entre diferentes proteínas
(iii) la naturaleza y fuerza de las interacciones proteína–tensioactivo y/o proteína–proteína en el seno de la solución y en la interfase.

En el caso de una mezcla proteínas–lípidos, el grado de interacción entre los diferentes componentes adsorbidos en la interfase aire–agua, depende de la composición interfacial y de la relación proteína/lípido en disolución *(Rodríguez Patino, Lucero, Rodríguez Niño, Mackie, Gunning & Morris, 2007; Rodríguez Patino, Rodríguez Niño & Carrera Sánchez, 2003; Rodríguez Patino, Rodríguez Niño & Carrera Sánchez, 2007)*. En general, la actividad superficial de estos sistemas viene dada por la proteína, en cuanto a que la proteína satura la interfase a altas concentraciones. Sin embargo, los lípidos aumentan la actividad superficial de las proteínas cuando la concentración de estas es baja en disolución *(Álvarez Gómez, Pizones Ruiz-Henestrosa, Carrera Sánchez & Rodríguez Patino, 2008a; Álvarez Gómez, Pizones Ruiz-Henestrosa, Carrera Sánchez & Rodríguez Patino, 2008b; Pizones Ruiz-Henestrosa, 2008)*.

En mezclas proteína–proteína, la adsorción es más compleja, ya que puede existir competencia, incompatibilidad o interacción de diferentes tipos entre las moléculas de proteína en el seno de la fase y en la interfase aire–agua o aceite–agua *(Damodaran, 2004; Damodaran & Sengupta, 2003; Dickinson & Matsumura, 1991; Mackie, Gunning, Ridout,*

Wilde & Morris, 2001; Sengupta & Damodaran, 2000; Xu & Damodaran, 1994).

En mezclas proteína–polisacárido puede existir competencia e incompatibilidad tanto en el seno de la fase y en la interfase *(Pérez, Carrera Sánchez, Rodríguez Patino & Pilosof, 2007)*. También pueden ocurrir interacciones entre ambos en la interfase aire–agua *(Baeza, Carrera Sánchez, Pilosof & Rodríguez Patino, 2005a; Baeza, Carrera Sánchez, Pilosof & Rodríguez Patino, 2004; Baeza, Carrera Sánchez, Rodríguez Patino & Pilosof, 2005b; Damodaran & Razmovsky, 2003),* lo que puede mejorar la funcionalidad de las proteínas adsorbidas *(Baeza et al., 2005b)*. Los polisacáridos son muy utilizados para la estabilización de emulsiones alimentarias y espumas *(Renard, Della Valle & Popineau, 2002)*. Muchos polisacáridos de alto peso molecular, debido a su hidrofilicidad, no poseen una gran tendencia para adsorberse en la interfase aire–agua, pero pueden mejorar enormemente la estabilidad de espumas proteicas actuando como agentes espesantes o gelificantes *(Carp, 2001; Dickinson, 2003)*. De forma general, la adición de polisacáridos produce un aumento en la cantidad de proteína adsorbida en la interfase aire–agua.

Sin embargo, existe cierta evidencia de que algunos polisacáridos intervienen en la formación de la película interfacial. La formación de complejos proteína–polisacárido en interfases ha sido relacionada a la mejora de las propiedades de películas estabilizadas por proteínas *(Dickinson, 2003)* y el fenómeno de volúmenes de exclusión se ha relacionado con una mayor adsorción de proteína en la interfase *(Dickinson & McClements, 1995; Tsapkina, Ssemenova, Pavlovskaya & Tolstoguzov, 1992)*.

Las propiedades reológicas de la goma xántica, junto con su conocida estabilidad en un amplio rango de pH y temperatura de trabajo, hacen de este polisacárido un agente espesante ideal en emulsiones alimentarias y espumas. La goma xántica es un polisacárido aniónico que desarrolla altas viscosidades a bajas concentraciones *(Imeson, 1992)*. La gran hidratación que se logra es atribuida a las cadenas laterales de carácter aniónico que consisten en unidades de α–D manosa, β–D glucurónico y piruvato, que ocurren periódicamente en la cadena de celulosa que forma la estructura principal de la goma. Este polisacárido, de gran hidrofilicidad y sin una importante cantidad de uniones de tipo hidrofóbicas, no se adsorbe en la interfase aire–agua *(Yilmazer, Carrillo & Kokini, 1991)*.

Los PGA constituyen un grupo especial de polisacáridos con actividad interfacial. Como se dijo anteriormente en el apartado **2.1** de esta introducción, estas gomas son producidas en un amplio rango de grados de esterificación que generan diferentes valores de viscosidad. Al aumentar el grado de esterificación se reduce el carácter hidrofílico de las moléculas que adquieren actividad superficial. La habilidad de los PGA para reducir la tensión superficial del agua, así como el aumento en la viscosidad de la fase acuosa los hacen convenientes como agentes estabilizadores en espumas. La sustitución de más del 50 % de los grupos carboxilo produce también en el PGA una mayor tolerancia a la acidez y a la presencia de iones calcio que otros alginatos. Debido a su actividad superficial, en presencia de proteínas podrían ocurrir fenómenos de competencia por la adsorción en la interfase *(Baeza, 2003)*.

4.2.5. Propiedades reológicas de las películas proteicas.

El conocimiento de la reología interfacial de las películas es importante en relación a la estabilización de espumas y emulsiones *(Halling, 1981; Neurath & Bull, 1938)*. Las propiedades viscoelásticas de la interfase han sido correlacionadas con la funcionalidad *(Halling, 1981; Kim & Kinsella, 1985; Nakai & Li-Chan, 1993; Phillips, 1981)*. Además, *Dickinson (1999)* y *Wilde (2000)* relacionaron ciertos aspectos de la estructura de proteínas con la reología superficial de las mismas y su correlación con la formación y estabilidad de espumas y emulsiones. Por otro lado, *Rodríguez Patino, Rodríguez Niño & Carrera Sánchez (2002)* afirman que la estructura de una película, que es una consecuencia de la existencia de interacciones entre las moléculas que la componen, determina las propiedades reológicas de la misma. Es decir, que las características reológicas superficiales son muy sensibles a la existencia de esas interacciones entre las moléculas presentes en la interfase y entre las moléculas de la interfase y las de la subfase *(Murray, 2002; Rodríguez Niño, 1996)*.

Las propiedades reológicas que se pueden determinar en una película son diferentes dependiendo de la deformación a que se ha sometido. Debe especificarse qué clase de tensión fue aplicada en las mediciones de viscosidad superficial *(Lucassen-Reynders, 1993)*.

(i) de cizalla: se somete a la película a esfuerzos que originan cambios en su forma, o

(ii) dilatacionales: se somete a la película a compresiones y expansiones que modifican su área.

En el primer caso, se refleja la atracción neta entre las proteínas de la película interfacial y entre esta última y las capas de líquido adyacentes. Es la fuerza requerida para desplazar y mover las moléculas de un punto a otro *(Martínez, 2007)*. Esta viscosidad superficial o resistencia a los esfuerzos de corte o de cizalla de la superficie de la película refleja la resistencia mecánica de la misma y es un parámetro importante relacionado con la estabilidad de espumas y emulsiones. En estas experiencias, se hace fluir a la película a través de un canal estrecho. Si ésta presenta ciertas propiedades de líquido, tenderá a fluir, pero con una resistencia a hacerlo, definiéndose de este modo la "viscosidad de cizalla interfacial".

Las propiedades reológicas que se obtienen a partir del segundo tipo de deformación poseen gran relevancia en los fenómenos de emulsificación y espumado, de acuerdo con la rápida expansión de la superficie durante dichas operaciones *(Murray, 2002; Rodríguez Patino et al., 2002)*. En las experiencias de reología interfacial dilatacional, se aplica una deformación sinusoidal del área que ocupa la película y se mide la variación sinusoidal resultante en la tensión superficial. La deformación aplicada está caracterizada por una amplitud máxima y una frecuencia de oscilación. La respuesta sinusoidal de la presión superficial derivada presenta la misma frecuencia que la deformación aplicada, pero estará o no en fase con ésta dependiendo de las características viscoelásticas de la película.
La elasticidad y la viscosidad de dilatación se pueden combinar en un único parámetro, el módulo viscoelástico superficial de la película (E) que vincula la variación de la presión superficial con los cambios del área superficial (A) ($E = -d\pi/d(\ln A)$) *(Kim & Kinsella, 1985)*.

Las interacciones proteína–proteína, el espesor de la película, la presión superficial desarrollada y las propiedades viscoelásticas están muy influenciadas por la carga neta de la proteína. Las películas formadas a valores de pH cercanos al punto isoeléctrico son más condensadas, más fuertes y se forman más rápido. La formación de uniones disulfuro durante la formación de la película también aumenta la estabilidad. La fuerza de las películas proteicas tiende a incrementarse con el tiempo, reflejando reordenamientos y el incremento de las interacciones entre las moléculas componentes de la película *(Kinsella & Phillips, 1989)*.

4.2.6. Técnicas para el estudio de las propiedades interfaciales.

Se han desarrollado numerosas metodologías para estudiar las propiedades interfaciales.
La tensión superficial se puede determinar por el método del volumen de las gotas (estalagmómetro de Traube), por caracterización de la forma y del tamaño de la gota (método de Sessile) y por distintos métodos dinámicos como el anillo de Du Noüy–Padday *(Padday, 1974)*, método de la gota pendiente *(Tornberg, 1978b; Tornberg, 1978c)*, tensiolaminómetro de la placa de Wilhelmy *(German, O´Neill & Kinsella, 1985; Graham & Phillips, 1979)*. En los últimos años se desarrollaron metodologías más modernas como las balanzas para películas tipo Langmuir donde se pueden estudiar procesos de relajación y dilatación por aplicación de ciclos de comprensión y expansión, por medio de mediciones dinámicas de presión superficial y área interfacial *(Rodríguez Niño, Carrera Sánchez & Rodríguez Patino, 1999)*. También se puede determinar la tensión superficial sometiendo a oscilaciones con determinada frecuencia a gotas ubicadas en el interior de un capilar o midiendo la amplitud y frecuencia de ondas generadas en un capilar lleno de líquido *(McClements, 1999c)*.
Las propiedades de flujo de las películas superficiales (umbral de fluencia, viscosidades, comportamiento no–newtoniano) se pueden determinar mediante un viscosímetro de tracción viscosa de un canal *(Mannheimer & Schechter, 1970)*, viscosímetros de anillo *(Blank, 1969; Blank & Britten, 1970)* o péndulo rotatorio *(Miller et al., 1998)*, cilindros de sobreflujo *(Prins, 1999)*.
Es posible realizar estudios morfológicos con microscopía del ángulo de Brewster *(Rodríguez Niño et al., 1999)*, microscopía electrónica de películas líquidas suspendidas en aire con análisis de imágenes *(Clark, Mackie, Wilde & Wilson, 1994; Miller et al., 1998)* y microscopía de fuerza atómica (AFM) por medio de la cual se observan las redes interfaciales *(Gunning, Wilde, Clark, Morris, Parker & Gunning, 1996)*.
Las interacciones coloidales que involucran biopolímeros adsorbidos en la interfase ocurren en general a distancias de nanómetros y son una combinación de fuerzas de Van der Waals, electrostáticas y de interacciones entrópicas y estéricas. La técnica de medición de fuerzas superficiales permite la determinación de las magnitudes de las fuerzas moleculares entre dos películas superficiales, resultando una técnica útil para determinar bases fundamentales de la funcionalidad y el comportamiento de proteínas *(Leckband & Israelachvili, 1993; Tsarkova, Protsenko & Klein, 2004)*.

5. Referencias.

Ahmed, J., & Ramaswamy, H. S. (2003). Effect of high-hydrostatic pressure and temperature on rheological characteristics of glycomacropeptide. *Journal of Dairy Science*, *86*, 1535-1540.

Álvarez Gómez, J. M., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M., Carrera Sánchez, C., & Rodríguez Patino, J. M. (2008a). The role of static and dynamic characteristics of diglycerol esters and β-lactoglobulin mixed films foaming. 1. Dynamic phenomena at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, *22*(6), 1105-1116.

Álvarez Gómez, J. M., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M., Carrera Sánchez, C., & Rodríguez Patino, J. M. (2008b). Role of static and dynamic characteristics of diglycerol esters and β-lactoglobulin mixed films on foaming, 2: Adsorption and foaming. *Food Hydrocolloids*, *22*(7), 1298-1309.

Alves, M. M., Antonov, Y. A., & Goncalves, M. P. (1999). The effect of structural features of gelatin on its thermodynamic compatibility with locust bean gum in aqueous media. *Food Hydrocolloids*, vol. 13 (pp. 157-166).

Andrade, J. D. (1985). Protein interactions with artificial surfaces. En: J. D. Andrade, *Surface and interfacial aspects of biomedical polymers*, vol. 2 (p. 470). New York, USA: Pleum Press.

Anema, S. G. (2001). Kinetics of the irreversible thermal denaturation and disulfide aggregation of α-lactalbumin in milk samples of various concentrations. *Journal of Food Science*, *66*, 2-9.

Anónimo (2002). Reference manual for US whey products. *US Dairy Export Council*. Arlington, VA, Estados Unidos.

Aymard, P., Durand, D., & Nicolai, T. (1996). The effect of temperature and ionic strength on the dimerisation of β-lactoglobulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, *19*, 213-221.

Baeza, R. (2003). Interacciones entre β-lactoglobulina y polisacáridos en coloides alimentarios. *Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. PhD* (p. 253). Buenos Aires, Argentina.

Baeza, R., Carrera Sánchez, C., Pilosof, A. M. R., & Rodríguez Patino, J. M. (2005a). Interactions of polysaccharides with β-lactoglobulin adsorbed films at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, *19*(2), 239-248.

Baeza, R. I., Carrera Sánchez, C., Pilosof, A. M. R., & Rodríguez Patino, J. M. (2004). Interactions of polysaccharides with β-lactoglobulin spread monolayers at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, *18*, 959-966.

Baeza, R. I., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2005b). Interactions between β-lactoglobulin and polysaccharides at the air-water interface and the influence on foam properties. En: E. Dickinson, *Food Colloids. Interactions, microstrucure and processing* (pp. 301-316). Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.

Barnett, L. B., & Bull, H. B. (1960). Electrophoresis of ribonuclease and of β-lactoglobulin: Isoelectric points of proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *89*(2), 167-172.

Beaulieu, M., Turgeon, S. L., & Doublier, J. L. (2001). Rheology, texture and microstructure of whey proteins/low methoxyl pectins mixed gels with added calcium. *International Dairy Journal*, *11*, 961-967.

BeMiller, J. N., & Whistler, R. L. (1996). Carbohydrates. En: O. R. Fenema, *Food Chemistry* (pp. 157-223). New York: Marcel Dekker.

Blank, M. (1969). Intermolecular interactions in newly spread serum albumin monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science*, *29*, 205-209.

Blank, M., & Britten, J. S. (1970). Determination of yield stress in surface films of lung extract. *Journal of Colloid and Interface Science*, *32*, 62-66.

Bos, A. M., & Van Vliet, T. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, *91*(3), 437-471.

Boye, I., Alli, I., & Ismail, A. A. (1997). Use of differential scanning calorimetry and infrared spectroscopy on the study of thermal and structural stability of α-lactalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 1116-1125.

Brash, J. L. (1981). Protein interactions with artificial surfaces. En: E. W. Salzman, *Interactions of blood with natural and artificial surfaces* (pp. 37-60). New York, USA: Marcel Dekker.

Brody, E. P. (2000). Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition*, *84*(1), S39-S46.

Bromley, E. H. C., Krebs, M. R. H., & Donald, A. M. (2005). Aggregation across the length-scales in β-lactoglobulin. *Faraday Discussions*, *128*, 13-27.

Brownlow, S., Cabral, J. H., Cooper, R., Fower, D. R., Yewdall, S. J., Polikarpov, I., North, A. C. T., & Sawyer, L. (1997). Bobine β-lactoglobulin at 1.8 Å resolution - still an enigmatic lipocain. *Structure*, *5*, 481-495.

Bryant, C. M., & McClements, D. J. (2000). Influence of xanthan gum on physical charactersitics of heat-denatured whey protein solutions and gels. *Food Hydrocolloids*, *14*, 383-390.

Bungenberg de Jong, H. G. (1949). *Colloids Science*. Amsterdam: Elsevier.

Burton, J., & Skudder, P. J. (1987). Whey proteins. UK patent application GB 2188526 A1.

Carp, D. J. (2001). Formación y estabilidad de espumas de proteínas de soja: efecto de la desnaturalización térmica y de la interacción con polisacáridos. *Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. PhD*. Buenos Aires, Argentina.

Cayot, P., & Lorient, D. (1996). Structure-function relationship of whey proteins. En: S. Damodaran, & A. Paraf, *Food Proteins and their applications* (pp. 225-256). New York: Marcel Dekker.

Clark, A. H., Kavanagh, G. M., & Ross-Murphy, S. B. (2001). Globular protein gelation-theory and experiment. *Food Hydrocolloids*, *15*, 383-400.

Clark, D. C., Mackie, A. R., Wilde, P. J., & Wilson, D. R. (1994). Differences in the structure and dynamics of th adsorbed layers in protein-stabilized model foams and emulsions. *Faraday Discussions*, *98*, 253-262.

Corredig, M. (2006). Protein-protein interactions in food. En: A. G. Gaonkar, & A. McPherson, *Ingredient interactions. Effects on food quality* (pp. 283-308). Boca Raton, FL, Estados Unidos: CRC Press Taylor & Francis Group.

Corredig, M., & Dalgleish, D. G. (1999). The mechanisms of the heat-induced interaction of whey proteins with casein micelles in milk. *International Dairy Journal*, *9*, 233-236.

Courthaudon, J. L., Girardet, J. M., Campagne, S., Rouhier, L. M., Campagna, S., Linden, G., & Lorient, D. (1999). Surface active and emulsifying properties of casein micelles compared to those of sodium caseinate. *International Dairy Journal*, *9*, 411-412.

Cherkaoui, S., Doumenc, N., Tachon, P., Neeser, J.-R., & Veuthey, J.-L. (1997). Development of a capillary zone electrophoresis method for caseinoglycomacropeptide determination. *Journal of Chromatography A*, *790*(1-2), 195-205.

Chobert, J. M., Touati, A., Bertrandharb, C., Dalgalorrondo, M., & Nicolas, M. G. (1989). Solubility and emulsifying properties of κ-casein and its caseinomacropeptide. *Journal of Food Biochemistry*, *13*, 457-473.

Dalgleish, D. G. (1992). Bovine milk protein properties and the manufacturing quality of milk. *Livestock Production Science*, *35*, 75-93.

Dalgleish, D. G. (1996). Food emulsions. En: J. Sjoblom, *Emulsions and emulsion stability* (pp. 287-321). New York, USA: Marcel Dekker.

Dalgleish, D. G. (1997). Adsorption of protein and stability of emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, *8*, 1-6.

Damodaran, S. (1996). Functional properties. En: S. Nakai, & H. W. Modler, *Food proteins. Properties and characterization* (pp. 167-234). New York: VCH.

Damodaran, S. (1997). Food protein: an overview. En: S. Damodaran, & A. Paraf, *Food proteins and their applications* (pp. 1-24). New York: Marcel Dekker.

Damodaran, S. (2004). Adsorbed layers formed from mixtures of proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *9*(5), 328-339.

Damodaran, S., & Razmovsky, L. (2003). Competitive adsorption and thermodynamic incompatibility of mixing of β-casein and gum arabic at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, *17*(3), 355-363.

Damodaran, S., & Sengupta, T. (2003). Dynamics of competitive adsorption of alphas-casein and beta-casein at planar triolein-water interface: evidence for incompatibility of mixing in the interfacial film. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(6), 1658-1665.

Das, K. P., & Kinsella, J. E. (1989). pH dependent emulsifying properties of β-lactoglobulin *Journal of Dispersion Science and Technology*, *10*(1), 77-102.

De Gennes, P. G. (1979). *Scaling concepts in polymer physics*. Ithaca, New York: Cornell University Press.

de Kruif, C. G., & Tuinier, R. (2001). Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*, *15*(4-6), 555-563.

de Kruif, C. G., Weinbreck, F., & de Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *9*(5), 340-349.

de Wit, J. N. (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*, *81*, 597-608.

de Wit, J. N., & Klarenbeek, G. (1984). Effects of heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, *67*, 2701-2710.

Delfour, A., Jolles, J., Alais, C., & Jolees, P. (1965). Caseino-glycopeptides: Characterization of a methionin residue and of the N-terminal sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *19*, 452-455.

Demetriades, K., Bryant, C. M., & McClements, D. J. (1998). Optimizing the functional properties of whey proteins to enhance nutritional benefits. *Recent Res. Devel. in Nutrition Res.*, *2*, 131-153.

Dickinson, E. (1992a). *An introduction to food colloids*. Oxford, UK: Oxford University Press.

Dickinson, E. (1992b). Protein at liquid interfaces. *An introduction to food colloids* (pp. 140-173). Oxford: Oxford University Press.

Dickinson, E. (1993). Protein-polysaccharide interactions in food colloids. En: E. Dickinson, & P. Walstra, *Food Colloids and polymers: stability and mechanical properties* (pp. 77-93). Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.

Dickinson, E. (1998). Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions. *Trend in Food Science and Technology*, *9*, 347-354.

Dickinson, E. (1999). Adsorbed protein layers at fluid interfaces: interactions, structure and surface rheology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *15*(2), 161-176.

Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, *17*(1), 25-39.

Dickinson, E., & Matsumura, Y. (1991). Time-dependent polymerization of β-lactoglobulin through disulphide bonds at the oil-water interface in emulsions. *International Journal of Biological Macromolecules*, *13*(1), 26-30.

Dickinson, E., & McClements, D. J. (1995). Protein-polysaccharide interactions. En: E. Dickinson, & D. J. McClements, *Advances in food colloids* (pp. 81-101). London: Chapman & Hall.

Dickinson, E., Narham, S. K., & Stainsby, G. (1989). Stability of cream. Liqueurs containing low-molecular-weight surfactants. *Journal of Food Science*, *54*, 77-81.

Dickinson, E., & Stainsby, G., eds (1982). *Colloids in food applied sciene*. London.

Doublier, J. L., Garnier, C., Renard, D., & Sanchez, C. (2000). Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *5*(3-4), 202-214.

Dziezak, J. D. (1991). A focus on gums. *Food Technology*, *45*, 117-132.

Dziuba, J., & Minkiewicz, P. (1996). Influence of glycosilation on micelle-stabilizing ability and biological properties of c-terminal fragments of cow´s k-casein. *International Dairy Journal*, *6*, 1017-1044.

Eigel, W., Butler, J., Ernstrom, C., Farrel, H., Harwalker, V., Jenness, R., & Whitney, R. (1984). Nomenclature of proteins of cow's milk. Fifth revision. *Journal of Dairy Science*, *67*, 1599-1631.

El-Salam, M. H. A., El-Shibiny, S., & Buchheim, W. (1996). Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. *International Dairy Journal*, *6*(4), 327-341.

FAO (1997). Parte III: La agroindustria y el desarrollo económico. *El estado mundial de la agricultura y la alimentación 1997*: FAO.

Fernandes, P. (1994). Viscoelastic characteristics of whey protein systems at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, *8*, 277-285.

Flory, P. J. (1953). *Principles of polymer chemistry*. Ithaca, New York: Cornell University Press.

Flory, P. J. (1974). Introductory lecture. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, *57*, 7-18.

Foegeding, E. A., & Hamann, D. D. (1992). Physicochemical aspects of muscle tissue behaviour. En: H. G. Schwartzberg, & R. W. Hartel, *Physical Chemistry of Foods* (pp. 423-441). New York: Marcel Dekker.

German, J. B., O´Neill, T. E., & Kinsella, J. E. (1985). Film forming and foaming behaviour of food proteins. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, *62*, 1358-1366.

Graham, D. E., & Philips, M. C. (1979). Proteins at liquid interfaces: II. Adsorption isotherms. *Journal of Colloid and Interface Science*, *70*, 415-426.

Graham, D. E., & Phillips, M. C. (1979). Proteins at liquid interfaces : I. Kinetics of adsorption and surface denaturation. *Journal of Colloid and Interface Science*, *70*(3), 403-414.

Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C., & Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Letters*, *32*, 195-198.

Grasselli, M., Navarro del Cañizo, A. A., Fernández Lahore, H. M., Miranda, M. V., Camperi, S. A., & Cascone, O. (1997). ¿Qué hacer con el suero de leche? , *Ciencia Hoy*, vol. 8. Buenos Aires, Argentina: Copyright Asociación Civil Ciencia Hoy.

Graveland-Bikker, J. F., & Anema, S. G. (2003). Effect of individual whey proteins on the rheological properties of acid gels prepared from heated skim milk. *International Dairy Journal*, *13*, 401-408.

Gray, C. J., Griffiths, A. J., Stevenson, D. L., & Kennedy, J. F. (1990). Studies on the chemical stability of propylene glycol alginate esters. *Carbohydrate Polymers*, *12*(4), 419-430.

Grinberg, V. Y., & Tolstoguzov, V. (1972). Thermodynamic compatibility of gelatin and some D-glucans in aqueous media. *Carbohydrate Research*, *25*, 313-320.

Grinberg, V. Y., & Tolstoguzov, V. B. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*, *11*, 145-158.

Grupo Veni Vidi Vici (2008). Carragenina. http://www.grupovvv.com/carragenina.html.

Gunning, A. P., Wilde, P. J., Clark, D. C., Morris, V. J., Parker, M. L., & Gunning, P. A. (1996). Atomic force microscopy of interfacial protein films. *Journal of Colloid and Interface Science*, *183*, 600-602.

Halling, P. J. (1981). Protein-stabilized foams and emulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *13*, 155-203.

Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., & McCelments, D. J. (2006). Characterization of β-lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, *20*, 577-585.

Haug, I. J., Skar, H. M., Vegarud, G. E., Langsrud, T., & Draget, K. I. (2009). Electrostatic effects on β-lactoglobulin transitions during heat denaturation as studied by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, *23*(8), 2287-2293.

Haynes, C. A., & Norde, W. (1994). Globular proteins at solid/liquid interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *2*(6), 517-566.

Hermansson, A. M. (1979). Methods of studying finctional characteristics of vegetable proteins. *Journal American Oil Chemistry Society*, *56*, 272-279.

Holt, C., & Sawyer, L. (1993). Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of the primary and secondary structures of $\alpha_{s2|}$-, β- and κ-caseins. *Journal of Chemical Society, Faraday Trans*, *89*, 2683-2692.

Holland, J. W., Deeth, H. C., & Alewood, P. F. (2006). Resolution and characterization of multiple isoforms of bovine kappa-casein by 2-DE following a reversible cysteine-tagging enrichment strategy. *Proteomics*, *6*(10), 3087-3095.

Iametti, S., Cairoli, S., De Gregori, B., & Bonomi, F. (1995). Modifications of high-order structures upon heating of β-lactoglobulin: dependen on the protein concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *43*, 53-58.

Iametti, S., De Gregori, B., Vecchio, G., & Bonomi, F. (1996). Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of β-lactoglobulin. *European Journal Biochemistry*, *237*, 106-112.

Imeson, A. (1990). Applications of alginates. En: G. O. Phillips, O. J. Wedlock, & P. A. Williams, *Gums and Stabilisers for the Food Industry*, vol. 5 (pp. 553-562). New York: IRL Press.

Imeson, A. (1992). *Thickening and gelling agents for foods*. London, New York: Blackie Academic & Professional.

Jachimska, B., Wasilewska, M., & Adamczyk, Z. (2008). Characterization of globular protein solutions by dynamic light scattering, electrophoretic mobility and viscosity measurements. *Langmuir*, *24*, 6866-6872.

Kawasaki, Y., Isoda, H., Shinmoto, H., Tanimoto, M., Dosako, S., & Idota, T. (1993a). Inhibition by κ-casein glycomacropeptide and lactoferrin of influenza virus hemmaglutination. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *57*, 1214.1215.

Kawasaki, Y., Isoda, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Idota, T., & Ahiko, K. (1992). Inhibition by lactoferrin and κ-casein glycomacropeptide of binding of Cholera toxin to its receptor. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *56*, 195-198.

Kawasaki, Y., Kawakami, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Tomizawa, A., & Kotake, M. (1993b). pH-dependent molecular weight changes of kappa-casein glycomacropeptide and its preparation by ultrafiltration. *Milchwissnschaft*, *48*, 191-196.

Kennedy, J. F., Griffiths, A. J., Philp, K., Stevenson, D. L., Kambanis, O., & Gray, C. J. (1989). Characteristics and distributions of ester groups in propylene glycol alginates. *Carbohydrate Polymers*, *11*(1), 1-22.

Kilara, A., & Vaghela, M. N. (2004). Whey proteins. En: R. Y. Yada, *Proteins in food processing* (pp. 72-99). Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited & CRC Press.

Kim, S. H. (1985). Structure, surface properties and foam stability of native, reduced and succinylated soy 11S globulins. New York, USA: Cornell University.

Kim, S. H., & Kinsella, J. E. (1985). Surface activity of food proteins: relationships between surface pressure development, viscoelasticity of interfacial films and foam stability of bovine serum albumin. *Journal of Food Science*, *50*, 1526-1530.

Kinsella, J. E. (1976). Functional properties of food proteins: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *7*, 219-280.

Kinsella, J. E. (1982). Relationship between structure and functional properties of food proteins. En: P. F. Fox, & J. J. Condon, *Food proteins* (p. 51). New York: Applied Science Publishers.

Kinsella, J. E., & Phillips, L. G. (1989). Structure: function relationships in food proteins, film and foaming behavior. En: J. E. Kinsella, & W. G. Soucie, *Food proteins* (pp. 52-77). Champaingn, IL, USA: AOCS.

Kreuβ, M., Krause, I., & Kulozik, U. (2008). Separation of a glycosylated and non-glycosylated fraction of caseinomacropeptide using different anion-exchange stationary phases. *Journal of Chromatography A*, *1208*, 126-132.

Kreuβ, M., Strixner, T., & Kulozik, U. (2009). The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropeptide. *Food Hydrocolloids*, *23*(7), 1818-1826.

Kuwajima, K., Harushima, Y., & Sugai, S. (1986). Influence of Ca^{+2} binding on the structure and stability of α-lactablumin studied by circular dichroism and nuclear magnetic resonance spectra. *International Journal of Peptide and Protein Research*, *27*, 18-27.

Leckband, D., & Israelachvili, J. (1993). Molecular basis of protein function as determined by direct force measurements. *Enzyme and Microbial Technology*, *15*(6), 450-459.

Li, M., & Lee, T. C. (2000). Effect of extrusion temperature on the solubility and molecular weight of lentil bean flour proteins containing low cysteine residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 880-884.

Lieske, B., Konrad, G., & Kleinschmidt, T. H. (2004). Isolation of caseinomacropeptide from rennet whey by a multistage ultrafiltration process. III. Influence of pH in the first ultrafiltration-step on the chemical properties of isolated caseinomacropeptide. *Milchwissenschaft*, *59*, 408-410.

Lucassen-Reynders, E. H. (1993). Interfacial viscoelasticity in emulsions and foams. *Food Structure*, *12*, 1-12.

Lucey, J. A., Tamehana, M., Singh, H., & Munro, P. A. (1998). A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture of glucono-δ-lactone. *Food Research International*, *31*, 147-155.

Mackie, A. R., Gunning, A. P., Ridout, M. J., Wilde, P. J., & Morris, V. J. (2001). Orogenic displacement in mixed β-lactoglobulin/β-casein films at the air/water interface. *Langmuir*, *17*(21), 6593-6598.

MacRitchie, F. (1978). Proteins at interfaces. *Advances in Protein Chemistry*, *32*, 283-326.

MacRitchie, F. (1990). *Chemistry at interfaces*. San Diego, CA: Academic Press.

Maldonado Valderrama, J. (2006). Caracterización interfacial de proteínas y tensioactivos: aplicación a dispersiones alimentarias. *Grupo de física de fluidos y biocoloides*, vol. Ph.D (p. 296). Granada, España: Universidad de Granada.

Malvern-Instruments Protein characterization using dynamic and static light scattering. *Application Note*, www.malvern.co.uk, 1-4.

Mangino, M. E. (1984). Physicochemical aspects of whey protein functonality. *Journal of Dairy Science*, *67*, 2711.

Mangino, M. E. (1992). Gelation of whey protein concentrates. *Food Technology*, *46*, 114-119.

Mannheimer, R. J., & Schechter, R. S. (1970). An improved apparatus and analysis for surface rheological measurements. *Journal of Colloids and Interface Science*, *32*, 195-211.

Manso, M. A., & López Fandiño, R. (2004). κ-casein macropeptides from cheese whey: Physicochemical, biological, nutritional, and technological features for possible uses. *Food Reviews International*, *20*, 329-355.

Marshall, S. (1991). Casein macropeptide from whey - a new product oportunity *Food Research Quaterly*, *51*, 86-91.

Martin Diana, A. B. (2001). Estudio del casinmacropeptido de suero de queseria, procedente de leche de oveja y cabra. *Instituto del Frío, CSIC*, vol. Ph.D. (p. 179). Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid.

Martínez, K. D. (2007). Impacto de la hidrólisis enzimática de las proteínas de soja en sus propiedades interfaciales, de espumado y en la interacción con polisacáridos. *Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*, vol. Ph.D (p. 243). Buenos Aires, Argentina: Universidad de Buenos Aires.

Mattison, K., Morfesis, A., & Kaszuba, M. (2003). A primer on particle sizing using dynamic light scattering. *Application Note*, *Malvern Instruments* www.malvern.co.uk, 1-3.

McClements, D. J. (1999a). Colloidal Interactions. En: D. J. McClements, *Food Emulsions. Principles, Practice and Techniques* (pp. 39-81). Florida, USA: CRC Press.

McClements, D. J. (1999b). Emulsion Ingredients. En: D. J. McClements, *Food emulsions: principles, practice and techniques* (pp. 83-124). Florida, USA: CRC Press.

McClements, D. J. (1999c). Interfacial properties and their characterization. En: D. J. McClements, *Food emulsions: principles, practice and techniques* (pp. 127-160). Florida, USA: CRC Press.

McClements, D. J. (2005). *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*. Boca Ratón, FL, USA: CRC Press.

McClements, D. J. (2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology Advances*, *24*, 621-625.

Mendoza, M. L. (2009). ¿Qué son las macroalgas marinas? http://www.cadic.gov.ar/Subpaginas/Divulgacion.html: CADIC-CONICET.

Mikkelsen, T., FrØkiœr, C., Topp, C., Bonomi, F., Iametti, S., Picariello, G., Ferranti, P., & Barkholt, V. (2005). Caseinomacropeptide self-association is dependent on whether the peptide is free or restricted in κ-casein *Journal of Dairy Science*, *88*, 4228-4238.

Miller, R., Krägel, J., Wüstneck, R., Wilde, P. J., Li, J. B., Fainerman, V. B., Loglio5, G., & Neumann, A. W. (1998). Adsorption kinetics and rheological properties of food proteins at air/water and oil/water interfaces. *Nahrung*, *42*(3-4), 225-228.

Minkiewicz, P., Slangen, C., Lagerwerf, F., Haverkamp, J., Rollema, H., & Visser, S. (1996). Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of bovine κ-casein macropeptide and characterization of isolated fractions. *Journal of Chromatography A*, *743*, 123-135.

Morr, C., & Ha, Y. W. (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functinal properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *33*, 431-476.

Morris, V. J. (1998). Gelation of polysaccharides. *Functional properties of food macromolecules* (pp. 143-226).

Mulvihill, D. M., & Donovan, M. (1987). Whey proteins and their thermal denaturation. A review. *Irish Journal of Food Science and Technology*, *11*, 43-75.

Murray, B. S. (2002). Interfacial rheology of food emulsifiers and proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *7*(5-6), 426-431.

Nakai, S. (1983). Structure-function relationships of food proteins with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *31*, 676-683.

Nakai, S., & Li-Chan, E. (1993). Recent advances in structure and function of food proteins, QSAR approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *33*, 477-499.

Nakano, T., & Ozimek, L. (2000). Purification of glycomacropeptide from dialyzed and non-dializable sweet whey by anion-exchange chromatography at different pH values. *Biotechnology Letters*, *22*, 1081-1086.

Nakano, T., & Ozimek, L. (2002). Isolation of glycomacropeptide from sweet whey by gel chromatography on sephacryl s-200 at pH 7.0 and 3.5. *Milchwissenschaft*, *57*, 128-130.

Ndi, E., Swanson, B., Barbosa-Canovas, G., & Luedecke, L. (1996). Rheology and microstructure of β-lactoglobulin/sodium polypectate gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*, 86-92.

Neurath, H., & Bull, H. B. (1938). The surface activity of proteins. *Chemical Reviews*, *23*, 391-435.

Norde, W., & Lyklema, J. (1991). Why proteins prefer interfaces. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *2*, 183-202.

Oakenfull, D., Pearce, J., & Burley, R. W. (1997). Protein gelation. En: S. Damodaran, & A. Paraf, *Food protein and their applications*. New York: Marcel Dekker, Inc.

Oh, S., Worobo, R. W., Kim, B., Rheem, S., & Kim, S. (2000). Detection of cholera toxin-binding activity of κ-casein macropeptide and optimization of its production by the response surface methodology. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *64*, 516-522.

Oliva, Y., Escobar, A., & Ponce, P. (2002). Caseinomacropéptido bovino: una alternativa para la salud. *Rev. Salud Anim.*, *24*(2), 73-81.

Olsson, C., Langton, M., & Hermansson, A.-M. (2002a). Dynamic measurements of β-lactoglobulin structures during aggregation, gel formation and gel break-up in mixed biopolymer systems. *Food Hydrocolloids*, *16*(5), 477-488.

Olsson, C., Langton, M., & Hermansson, A. M. (2002b). Microstructures of β-lactoglobulin/amylopectin gels on different length scales and their significance for rheological properties. *Food Hydrocolloids*, *16*, 111-126.

Ono, T., Yada, R., Yutani, K., & Nakai, S. (1987). Comparison of conformations of κ-casein, para-κ-casein and glycomacropeptide. *Biochimica et Biophysica Acta*, *911*, 318-325.

Padday, J. F. (1974). Sessile drop profiles: A comparison with Searle's equation for drop height. *Journal of Colloid and Interface Science*, *48*(1), 170-171.

Pérez, O. E., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2007). Adsorption dynamics and surface activity at equilibrium of whey proteins and hydroxypropyl-methyl-cellulose mixtures at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, *21*, 794-803.

Phillips, L. G., Whitehead, D. M., & Kinsella, J. E. (1994a). Chapter 4: Structural and chemical properties of β-lactoglobulin. En: S. L. Taylor, *Structure-function properties of food proteins* (pp. 75-106). San Diego, California, Estados Unidos: Academic Press, Inc.

Phillips, L. G., Whitehead, D. M., & Kinsella, J. E. (1994b). Protein Films. En: L. G. Phillips, D. M. Whitehead, & J. E. Kinsella, *Structure-function properties of food proteins* (pp. 111-130). San Diego, California, USA: Academic press.

Phillips, P. M. (1981). Protein Conformation at Liquid Interfaces and Its Role in Stabilizing Emulsions and Foams. *Food Technology*, *35*, 50-58.

Pilosof, A. M. R. (2000). Gelificación. En: A. M. R. Pilosof, & G. B. Bartholomai, *Caracterización funcional y estructural de proteínas* (pp. 75-95). Buenos Aires, Argentina: Eudeba.

Piriz, M. L. (1993). Situación de la industria de los carragenanos en América del Sur. En: J. A. Zertuche Gonzalez, *Situacion actual de la industria de macroalgas productoras de ficocoloides en America Latina y el Caribe* (p. 66). D. F., México: FAO.

Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M. (2008). Optimización de las propiedades interfaciales y espumantes de la globulina de soja. *Departamento de Ingeniería Química*, vol. Ph.D (p. 246). Sevilla, España: Universidad de Sevilla.

Polyakov, V. I., Grinberg, V. Y., & Tolstoguzov, V. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins. *Food Hydrocolloids*, *11*, 171-180.

Prins, A. (1999). Stagnant surface behaviour and its effect on foam and film stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *149*, 467-473.

Qi, X. L., Brownlow, S., Holt, C., & Sellers, P. (1995). Thermal denaturation of β-lactoglobulin: effect of protein concentration at pH 6.75 and pH 8.05. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1248*, 43-49.

Relkin, P. (1996). Thermal unfolding of β-lactoglobulin, α-lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *36*(6), 565-601.

Renard, D., Della Valle, G., & Popineau, Y. (2002). *Plant biopolymer science. Food and non-food applications*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.

Rodríguez Niño, M. R. (1996). Estudio de películas de lípidos y proteínas sobre la intefase aire-medio acuoso. *Departamento de Ingeniería Química, PhD*. Sevilla, España: Universidad de Sevilla.

Rodríguez Niño, M. R., Carrera Sánchez, C., & Rodríguez Patino, J. M. (1999). Interfacial characteristics of β-casein spread films at the air-water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *12*, 161-173.

Rodríguez Patino, J. M., de la Fuente Feria, J., & Gómez Herrera, C. (1990). Monocapas de emulsionantes alimentarios. *Grasas y Aceites*, *41*, 179-189.

Rodríguez Patino, J. M., Lucero, A., Rodríguez Niño, M. R., Mackie, A. R., Gunning, P., & Morris, V. J. (2007). Some implications of nanoscience in food dispersion formulations containing phospholipids as emulsifiers. *Food Chemistry*, *102*(2), 532-541.

Rodríguez Patino, J. M., Rodríguez Niño, M. R., & Carrera Sánchez, C. (2002). Propiedades funcionales de lípidos y proteínas de interés para la formulación de dispersiones alimentarias. En: M. C. Añón, & A. M. R. Pilosof, *Proteínas y Polisacáridos como ingredientes funcionales* (pp. 11-28). La Plata, Argentina: Editorial de la Universidad de La Plata.

Rodríguez Patino, J. M., Rodríguez Niño, M. R., & Carrera Sánchez, C. (2003). Protein-emulsifier interactions at the air-water interface. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *8*(4-5), 387-395.

Rodríguez Patino, J. M., Rodríguez Niño, M. R., & Carrera Sánchez, C. (2007). Physico-chemical properties of surfactant and protein films. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *12*, 187-195.

Rodríguez Patino, J. M., Rodríguez Niño, M. R., Carrera Sánchez, C., Cejudo Fernández, M., Navarro García, J. M., & Rodríguez Mateos, G. (2000). Estructura y funcnionalidad de películas de proteínas de interés alimentario sobre interfases fluido-fluido. En: J. Vioque, A. Clemente, J. Bautista, & M. F., *Jornada Internacional sobre proteínas alimentarias*. Sevilla, España: Universidad de Sevilla.

Sand, R. E. (1982). Nomenclature and structure of carbohydrate hydrocolloids. En: M. Glicksman, *Food Hydrocolloids*, vol. 1 (pp. 19-46). Boca Ratón, FL: CRC Press.

Sanderson, G. R. (1986). Gums and their use in food systems. *Food Technology*, *50*(3), 81-85.

Sawyer, L., Brownlow, S., Polikarpov, I., & Wu, S.-Y. (1998). β-lactooglobulin: Structural studis, biological clues. *International Dairy Journal*, *8*, 65-72.

Schaller, A. (2009). Sueros de lechería. Cadenas Alimentarias. Dirección de Industria Alimentaria y Agroindustrias.

Schokker, E. P., Singh, H., & Creamer, L. K. (2000). Heat-induced aggregation of β-lactoglobulin A and B with α-lactalbumin. *International Dairy Journal*, *10*, 843-853.

Semenova, M. G. (1996). Factors determining the character of biopolymer-biopolymer interactions in multicomponent aqueous solutions modeling food systems. En: N. Parris, A. Kato, L. K. Creamer, & J. Pearce, *Macromolecular Interactions in Food Technology* (pp. 37-49). Washington, DC-USA: American Chemical Society.

Sengupta, T., & Damodaran, S. (2000). Incompatibility and phase separation in a bovine serum albumin/β-casein/water ternary film at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, *229*(1), 21-28.

Silva-Hernández, E., Nakano, T., & Ozimek, L. (2002). Isolation and analysis of κ-casein glycomacropeptide from goat sweet whey. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 2034-2038.

Stading, M., & Hermansson, A. M. (1990). Viscoelastic behaviour of β-lactoglobulin structures. *Food Hydrocolloids*, *4*(2), 121-135.

Syrbe, A., Fernandes, P. B., Dannenberg, F., Bauer, W., & Klostermeyer, H. (1995). Whey protein + polysaccharide mixtures: polymer incompatibility and its applications. En: E. Dickinson, & D. Lorient, *Food Colloids and Macromolecules* (pp. 328-339). Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.

Thomä-Worringer, C., Sørensen, J., & López Fandiño, R. (2006). Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *International Dairy Journal*, *16*, 1324-1333.

Thomä Worringer, C., Siegert, N., & Kulozik, U. (2007). Foaming properties of caseinomacropeptide - 1. Impact of concentration and interactions with whey proteins. *Milchwissenschaft*, *62*, 249-252.

Timasheff, S. N., Townend, R., & Mescanti, L. (1966). The optical rotatory dispersions of the β-lactoglobulins *Journal of Biological Chemistry*, *241*, 1863-1870.

Tolstoguzov, V. (1986). Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. En: J. R. Mitchell, & D. A. Ledward, *Functinal properties of food macromolecules* (pp. 385-411). London: Elsevier Applied Science Publishers.

Tolstoguzov, V. (1990). Interactions of gelatin with polysaccharides. En: G. O. Phillips, P. A. Williams, & D. J. Wedlock, *Gums and stabilisers for the food industry* (pp. 157-175). Oxford: IRL Press.

Tolstoguzov, V. (1991). Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, *4*, 429-468.

Tolstoguzov, V. (1993). Functional properties of food proteins. Role of interactions in protein systems. En: K. D. Schwenke, & R. Mothes, *Food proteins, structure and functionality* (pp. 203-209). Weinheim: VCH.

Tolstoguzov, V. (1994). Some physico-chemical aspects of protein processing into foods. En: G. O. Phillips, P. A. Williams, & D. J. Wedlock, *Gums and stabilisers for the food industry* (pp. 115-124). Oxford: IRL Press.

Tolstoguzov, V. (1997). Protein-polysaccharide interactions. En: S. Damodaran, & A. Paraf, *Food proteins and their applications* (pp. 171-198). New York: Marcel Dekker.

Tolstoguzov, V. (2001). Thermodynamic aspects of biopolymer functionality in biological systems, food and beverages. *Critical Reviews in Biotechnology*, *22*(2), 89-174.

Tolstoguzov, V. (2003). Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*, *17*, 1-23.

Tolstoguzov, V., Grinberg, V., & Gulov, A. (1985). Some physicochemical approaches to the problem of protein texturisation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *33*, 151-159.

Tornberg, E. (1978a). The applacation of the drop volume technique to measurements of the adsorption of proteins at interfase. *Journal of Colloid and Interfase Science*, *64*, 391 - 402.

Tornberg, E. (1978b). The applacation of the drop volume technique to measurements of the adsorption of proteins at interfase. *Journal of Colloid and Interfase Science*, *64*, 391-402.

Tornberg, E. (1978c). The interfacial behaviour of three food proteins studied by the drop volume technique. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *29*, 762-776.

Townend, R., Herskovits, T. T., Swaisgood, H. E., & Timasheff, S. N. (1964). The solution properties of β-lactoglobulin C. *The Journal of Biological Chemistry*, *239*(12), 4196-4201.

Tsapkina, E. N., Ssemenova, M. B., Pavlovskaya, G. E., & Tolstoguzov, V. B. (1992). The influence of incompatibility on the formation of adsorbing layers and dispersions of n-decane emulsion droplets in aqueous solution containing a mixture of 11S globulin from *Vicia faba* and dextran. *Food Hydrocolloids*, *6*, 237-251.

Tsarkova, L. A., Protsenko, P. V., & Klein, J. (2004). Interactions between Langmuir–Blodgett polymer monolayers studied with the surface force apparatus. *Colloid Journal*, *66*(1), 84-94.

Turgeon, S. L., & Beaulieu, M. (2001). Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, *15*(4-6), 583-591.

Vardhanabhuti, B., & Foegeding, E. A. (1999). Rheological properties and characterization of polymerized whey protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 3649-3655.

Verheul, M., Pedersen, J. S., Roefs, S. P. F. M., & de Kruif, K. G. (1999). Association behavior of native β-lactoglobulin *Bipolymers*, *49*, 11-20.

Walkenstrom, P., Panighetti, N., Windhab, E., & Hermansson, A. M. (1998). Effects of fluid shear and temperature on whey protein gels, pure or mixed with xanthan. *Food Hydrocolloids*, *12*, 469-479.

Walstra, P. (1996). Dispersed systems: basic considerations. En: O. R. Fenema, *Food Quemistry* (pp. 95-155). New York: Marcel Dekker.

Wang, T., & Lucey, J. A. (2003). Use of multi-angle laser light scattering and size-exclusion chromatography to characterize the molecular weight and types of aggregates present in commercial whey proteins products. *Journal of Dairy Science*, *86*, 3090-3110.

Whitney, R. M. (1988). Proteins in milk. En: N. P. Wong, R. Jenness, M. Keeney, & E. H. Marth, *Fundamentals of Dairy Chemistry* (pp. 89-92). New York: Van Nostrand Reinhold.

Wilde, P. J. (2000). Interfaces: their role in foam and emulsion behaviour. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *5*(3-4), 176-181.

Wilde, P. J., & Clark, D. C. (1996). Foam formation and stability. En: G. M. Hall, *Methods of testing protein functionallity* (pp. 110-152). London, England: Blakie Academic & Professional.

Xu, S., & Damodaran, S. (1994). Kinetics of adsorption of protein at the air-water interface from a binary mixture. *Langmuir*, *10*, 472-480.

Xu, Y., Sleigh, R., Hourigan, J., & Johnson, R. (2000). Separation of bovine immunoglobulin G and glycomacropeptide from dairy whey. *Process Biochemistry*, *36*, 393-399.

Yilmazer, A. R., Carrillo, A. R., & Kokini, J. (1991). Effect of propylene glycol alginate and xanthan gum on stability of o/w emulsions. *Journal of Food Science*, *56*, 513-517.

Zasypkin, D. V., Dumay, E., & Cheftel, J. C. (1996). Pressure and heat-induced gelation of mixed β-lactoglobulin/xanthan solutions. *Food Hydrocolloids*, *10*, 203-211.

Objetivos

Objetivo general.

- Estudiar el impacto de las interacciones entre β–lg y CMP y entre ellos y polisacáridos en diferentes coloides alimentarios.

Objetivos específicos.

- Estudiar las interacciones a nivel molecular entre β–lg y CMP en solución y su impacto en la formación de geles e interfases.

- Estudiar las interacciones entre proteínas lácteas y polisacáridos y su impacto en la formación de geles e interfases.

Materiales y métodos

1. Materiales.

Las proteínas utilizadas fueron: β–lactogobulina (β–lg) (de dos marcas diferentes) y caseinoglicomacropéptido (CMP).

Una de las muestras de β–lg fue gentilmente donada por la firma Besnier & Bridel (Laval Cedex, Francia). Este concentrado contenía las variantes A y B de β–lg y fue usado sin purificación posterior. El contenido de β–lg en el polvo seco fue de 95 % en base seca.

La otra muestra de β–lg utlizada fue BioPURE β–lactoglobulina provista por Davisco Foods International, Inc. (Le Sueur, Minnesota, Estados Unidos). Su composición fue: 97,8 % de proteína (base seca) siendo β–lactoglobulina el 93,6 % del total de proteínas, 0,3 % de grasa, 1,8 % de ceniza y 5,0 % de humedad.

En la **Figura 20** se muestra una electroforesis en condiciones disociantes (con SDS) de las proteínas utilizadas.

Ambas β–lg presentan una banda mayoritaria correspondiente a la forma monomérica de la β–lg (PM 18,4 kDa). También se observa una pequeña contaminación con α–la en ambos casos y en la β–lg de Davisco se observa además una débil banda correspondiente a BSA y otra mayor a la forma dimérica de β–lg (36,8 kDa).

La muestra de CMP fue BioPURE GMP caseinoglicomacropéptido, también provista por Davisco Foods International, Inc. (Le Sueur, Minnesota, Estados Unidos). Su composición fue: 79,0 % de proteína (en base seca), siendo CMP el 86,3 % del total de proteínas, 0,6 % de grasa, 6,3 % de ceniza y 6,4 % de humedad. Este péptido fue también analizado por electroforesis (**Figura 20**). La tinción de esta muestra es muy débil y presenta una banda muy ancha e irregular. *Silva–Hernández, Nakano & Ozimek (2002)* sugirieron que la amplitud de la banda se debe a la variación en el contenido de carbohidratos en el CMP. Además la poca tinción de la muestra se debe a la baja afinidad que tiene este péptido con el Coomassie Blue *(Etzel, 1999; Nakano, Ikawa & Ozimek, 2007)*. La banda ancha que se observa corresponde a formas agregadas del CMP *(Nakano et al., 2007; Silva-Hernández, Nakano, Verdalet-Guzmán & Ozimek, 2004)*.

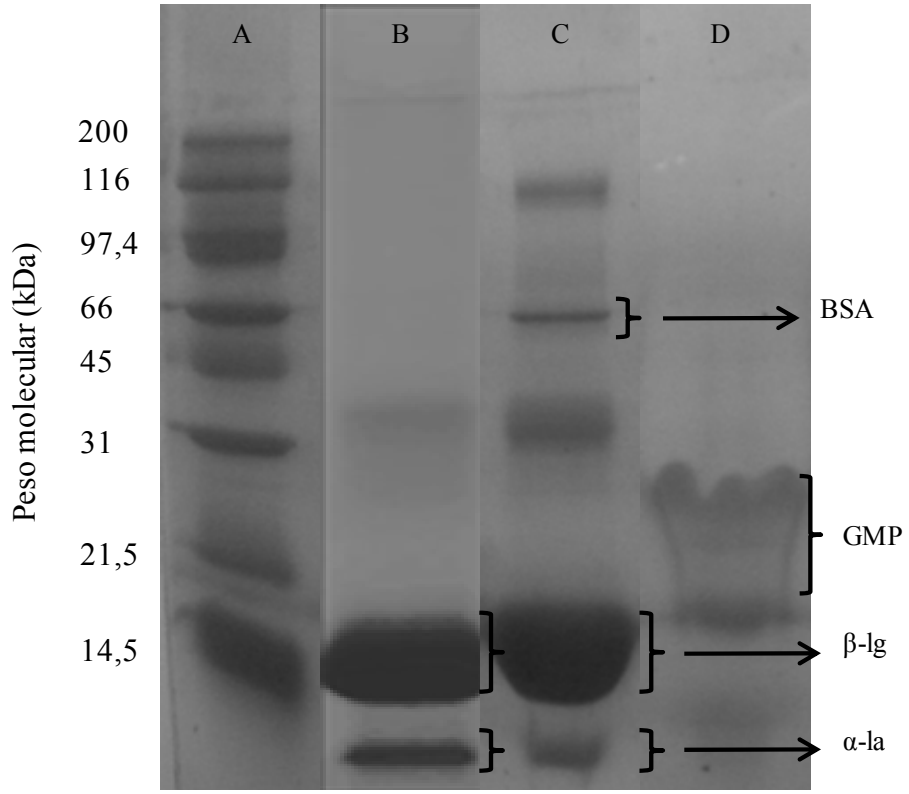


Figura 20. Perfil electroforético de: (A) estándar de peso molecular de BioRad con sus valores correspondientes en kDa, (B) β–lactoglobulina (Besnier & Bridel), (C) β–lg (Davisco Foods International) y (D) CMP (Davisco Foods International).

Con respecto a los polisacáridos, se utilizaron tres variedades comerciales de alginato de propilenglicol (PGA) de la firma ISP Alginates en sus formas comerciales *Manucol* (MAN), *Kelcoloid O* (KO) y *Kelcoloid LVF* (KLVF) que difieren en el grado de esterificación y viscosidad (**Tabla 7**).

Tabla 7. Grado de esterificación y viscosidad de alginatos de propilenglicol.

PGA	Grado de esterificación[a]	Viscosidad (cp)[b]
Kelcoloid LVF (KLVF)	Medio (48 – 62 %)	Alta (13,9)
Manucol éster (MAN)	Alto (78 – 85 %)	Alta (11,8)
Kelcoloid O (KO)	Alto (78 – 85 %)	Baja (4,7)

[a] dato proporcionado por ISP Alginates, [b] viscosidad (60 s^{-1}) de soluciones al 0,5 % p/p *(Baeza, 2003)*.

Además, para los estudios interfaciales también se utilizó goma xántica (GX) y λ–carragenano (λ–C), ambos de Sanofi Bioindustries.

La preparación de las soluciones fue diferente según el tipo de estudio.

Para las determinaciones de las propiedades interfaciales se utilizaron soluciones buffer para disolver las muestras en polvo mientras que para el resto de los estudios las soluciones fueron preparadas en agua Mili–Q.

Además para poder explicar el comportamiento observado en las determinaciones interfaciales se realizaron mediciones de tamaño de partícula (explicado más adelante) en soluciones de CMP y β–lg preparados en los mismos sistemas buffer utilizados en las mediciones interfaciales.

Las soluciones buffer utilizadas fueron preparadas a partir de ácido acético y acetato de sodio de grado analítico para las soluciones a pH 4 y 5 y a partir de Trizma (Sigma, > 99,5 %) $(CH_2OH)_3CNH_2$/$(CH2OH)_3CNH_3Cl$ para la solución a pH 7. La fuerza iónica en todas las soluciones buffer fue 0,05 M.

En el caso de las soluciones preparadas en agua se les ajustó el pH por medio del agregado de HCl o NaOH 0,1 o 1 N según el caso.

Todas las soluciones fueron preparadas, agitadas durante 30 minutos y mantenidas en la heladera (4 °C) por 24 h previo a la medición. Además a todas las muestras tanto en agua como en buffer se les agregó 0,02 % de NaN_3 para prevenir el crecimiento bacteriano.

2. Métodos.

2.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Se estudiaron las transiciones térmicas a pH 7 y 3,5 de β–lg sola, CMP solo y de las mezclas de ambos en las siguientes relaciones CMP:β–lg: 25:75, 50:50 y 75:25 mediante un calorímetro diferencial de barrido Mettler TA 4000. La concentración total de proteína, tanto en los sistemas de proteína sola como en los mixtos fue de 15 % p/p.

Los termogramas y parámetros térmicos correspondientes a la desnaturalización proteica se obtuvieron mediante el software de análisis TA72. Previamente se calibró el equipo con Indio según *Ross & Karel (1991)*.

Las mediciones se llevaron a cabo en cápsulas de aluminio con una capacidad de 160 µl, herméticamente selladas, donde se colocó un volumen de 60 µl de solución. Se utilizó una cápsula vacía como referencia.

Todas las mediciones se realizaron a una velocidad de calentamiento de 10 ºC/min, desde 5 a 100 ºC.

Los parámetros calorimétricos analizados fueron: temperatura de inicio (T_o), determinada como la temperatura obtenida por la intersección de la línea de base con la pendiente descendente de la curva al comenzar la transición térmica *(Class, Dalton & Hancock, 1999; Relkin, 1994)* y temperatura de pico (T_p) de la endoterma que indica la temperatura aparente de desnaturalización de la proteína.

2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).

Se realizaron electroforesis nativas y disociantes de las proteínas mediante el procedimiento general de *Laemmli (1970)* en un equipo Mini–Protean II de Bio–Rad Laboratories (Hercules, Estados Unidos). Todos los reactivos utilizados en los ensayos de electroforesis fueron de Bio Rad.

Las condiciones de la medición fueron las siguientes:

Volumen de siembra: 20 µl conteniendo 40 µg de proteína por calle.

Buffer de muestra: 0,5 M de Tris–HCl (pH 6,8); 25 % v/v de glicerol; 0,05 % p/v de azul de bromofenol; 2 % p/v de dodecil sulfato de sodio (SDS).

Buffer de corrida: 0,025 M de Tris–Base (pH 8,3); 0,192 M de glicina; 0,1 % p/v de SDS.

Gel separador: 1,5 M de Tris–HCl (pH 8,8); 15 % de acrilamida (30 % p/v acrilamida; 0,8 % p/v de bisacrilamida); 0,1 % p/v de SDS.

Gel concentrador: 0,5 M de Tris–HCl (pH 6,8); 4 % de acrilamida (30 % p/v acrilamida; 0,8 % p/v de bisacrilamida); 0,1 % p/v de SDS.

La polimerización de los geles se inició por el agregado de 10 % p/v de persulfato de amonio y 0,5 % de N, N, N,´N´–tetrametil–etilén–diamida (TEMED).

Temperatura: ambiente.

Voltaje: 200 V.

Corriente: 500 mA.

Todas estas condiciones fueron las utilizadas para realizar las corridas electroforéticas en condiciones desnaturalizantes. Para el caso de las nativas, se cambió el agregado de SDS por la misma cantidad de agua destilada en todos los casos.

Las muestras fueron mezcladas en una proporción (1:4) con el buffer de siembra.
Las electroforesis tuvieron una duración aproximada de 45 minutos. Luego de terminada la corrida, se tiñeron los geles con una solución de Coomassie Blue R–250 (0,1 % p/v en una mezcla 4,5:4,5:1 metanol (CH_3OH):agua:ácido acético glacial (CH_3COOH)) y luego se destiñó con una mezcla 8:1:1 de metanol:ácido acético glacial:agua *(Bollag & Edelstein, 1991)*.
El estándar (Bio–Rad) utilizado fue el siguiente (se informa el peso molecular (kDa) y la proteína a la que corresponde): 200 (miosina); 116 (β–galactosidasa); 97,1 (fosfolipasa B); 66 (sero albúmina bovina); 45 (ovoalbúmina); 31 (anhidrasa carbónica); 21,5 (inhibidor de tripsina); 14,5 kDa (lisozima) y 6,5 kDa (aprotinina).

2.3. Medición del tamaño de partícula.

Las mediciones de tamaño de partícula fueron realizadas en un equipo de dispersión dinámica de luz (DLS) láser, Zetasizer Nano–Zs de Malvern Instruments (Malvern, Inglaterra) como el que se observa en la **Figura 21** provisto de un láser He–Ne (633 nm) y un correlator digital, modelo ZEN3600. Las mediciones fueron realizadas a un ángulo de dispersión de 173 º. El rango de medición del equipo es 0,6 – 6000 nm.

Se realizaron mediciones de tamaño de partícula a temperatura ambiente y también durante la exposición de la muestra a una rampa de calentamiento dentro del equipo. La rampa de calentamiento constó de un aumento desde 25 °C hasta 85 °C en etapas de 5 °C y manteniendo la muestra durante 5 minutos a cada temperatura, durante ese tiempo se registraba el tamaño de partícula.

La muestra se coloca en una celda dentro del compartimento que se observa abierto en la **Figura 21**. La celda utilizada fue de poliestireno para las mediciones realizadas a temperatura ambiente y de vidrio para las mediciones sometidas a tratamiento térmico.
Las soluciones fueron filtradas a través de microfiltros Whatman International Ltd. (Maidstone, Inglaterra) de 0,45, 0,22 y 0,02 μm.

Figura 21. Equipo de dispersión dinámica de luz láser, Zetasizer Nano–Zs, Malvern Instruments.

En DLS, la muestra es iluminada con un láser y la intensidad de la luz dispersada producida por las partículas fluctúa a una velocidad que es dependiente del tamaño de las partículas. Como se mencionó en la **Introducción**, el análisis de la intensidad de estas fluctuaciones permite estimar el coeficiente de difusión translacional (*D*) de la partícula y a partir de éste el tamaño de la misma mediante la ecuación de Stokes–Einstein:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \qquad \textbf{(ecuación 1)}$$

donde, *d(H)*: diámetro hidrodinámico (m); *D*: coeficiente de difusión translacional ($m^2.s^{-1}$); *k*: constante de Boltzmann (1,38 x 10^{-23} $N.m.K^{-1}$); *T*: temperatura absoluta (K); η: viscosidad ($N.s.m^{-2}$).

El tamaño se obtiene a partir de la función de correlación usando varios algoritmos. Se pueden considerar dos aproximaciones:

(i) Análisis de Cumulantes: se ajusta una exponencial simple a la función de correlación para obtener el tamaño promedio (diámetro hidrodinámico promedio o "z–average") y una estimación del ancho de la distribución (índice de polidispersidad). El índice de polidispersidad refleja el grado de asociación *(Haque, Casay, Wilson, Antila & Antila, 1993; Haque & Sharma, 1997)*. Los resultados que se obtienen mediante este análisis son aplicables con propósitos de comparación de un simple valor pero es inadecuado para dar una completa descripción de los resultados de la distribución en sistemas polidispersos.

(ii) Análisis de Contin: se ajusta una exponencial múltiple a la función de correlación para obtener la distribución porcentual de tamaños de partículas *(Stepanek, 1993)*. La distribución de tamaño obtenida es un gráfico de la intensidad relativa de luz dispersada por las partículas en varias clases de tamaños y por lo tanto se define como distribución de tamaño por intensidad. Aunque la distribución de tamaño fundamental generada por el equipo es la distribución por intensidad, ésta se puede convertir, mediante la teoría de *Mie (1908)*, a distribución por volumen con el objetivo de analizar la importancia de los diferentes picos en relación a la cantidad de partículas que lo conforman.

Una forma muy simple de describir las diferencias entre las distribuciones de intensidad, volumen y número es considerar por ejemplo dos poblaciones de partículas esféricas de 5 y 50 nm de diámetro presentes en igual cantidad. Si se grafica una distribución de número de estas dos poblaciones de partículas, el gráfico consistirá en dos picos (ubicados a 5 y 50 nm) obteniendo una relación 1:1 (**Figura 22A**). Si en cambio se grafica una distribución en volumen (**Figura 22B**), entonces la relación de estos dos picos cambia a 1:1000 (porque el volumen de una esfera es $4/3\pi(d/2)^3$). Por último si quisiéramos graficar una distribución de intensidad (**Figura 22C**), la relación entre los dos picos sería de 1:1000000 (porque la intensidad de dispersión es proporcional al *diámetro*^{6} a partir de la aproximación de Rayleighs) *(Malvern-Instruments)*.

Es importante recordar que en DLS, la distribución que se obtiene es en intensidad y que las distribuciones de volumen y número son obtenidas a partir de ésta, de aquí la importancia de que la lectura del tamaño de partícula se haga a partir de la distribución en intensidad.

En este trabajo se analizarán en primer lugar las distribuciones en intensidad y luego las distribuciones en volumen, ya que da una visión más realista de la importancia de los picos.

La distribución en número no se evaluará ya que arrastra muchos errores a partir de su cálculo y no aporta información extra.

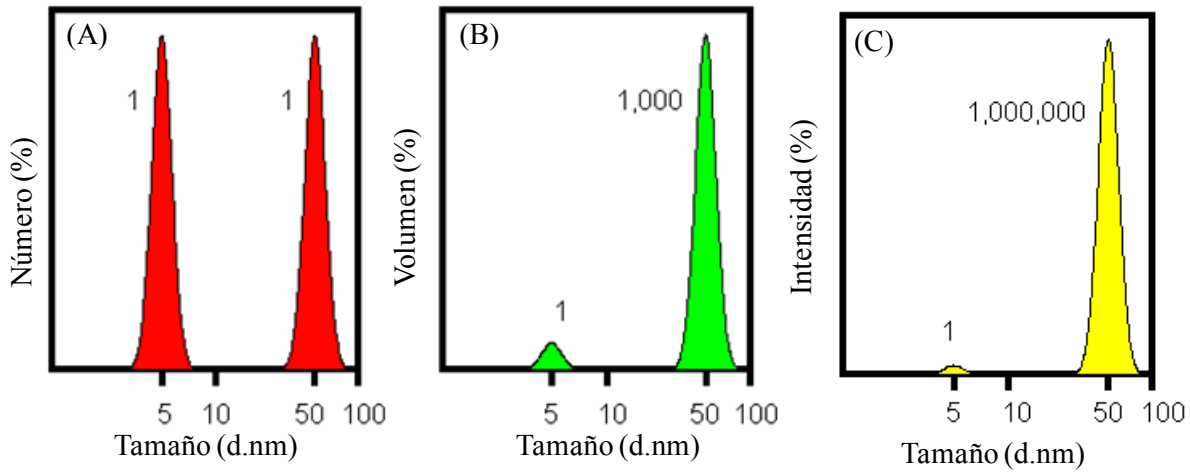


Figura 22. Distribución en (A) número, (B) volumen y (C) intensidad de una muestra bimodal de partículas de 5 y 50 nm presentes en igual cantidad.

Todos los ensayos de tamaño de partícula se realizaron por triplicado, y se informa un promedio.

2.4. Test de inclinación o "tilting test".

Se determinó la concentración crítica de gelificación de β–lg y CMP solos a diferentes pH por medio del test de inclinación *(Relkin, Meylheuc, Launay & Raynal, 1998)*. En un baño seco a temperatura constante, se calentaron tubos conteniendo 1 ml de solución. Con el objetivo de prevenir evaporación de líquido los tubos fueron cerrados herméticamente. A tiempos sucesivos se retiraron los tubos del baño y se observaron; se determinó el tiempo de gelificación (t_{tilt}) como el tiempo necesario para que el menisco de la solución contenida en los tubos no sufra deformación o "no fluya" al inclinarlo.

En el siguiente esquema se muestra el procedimiento de obtención del punto gel (**Figura 23**).

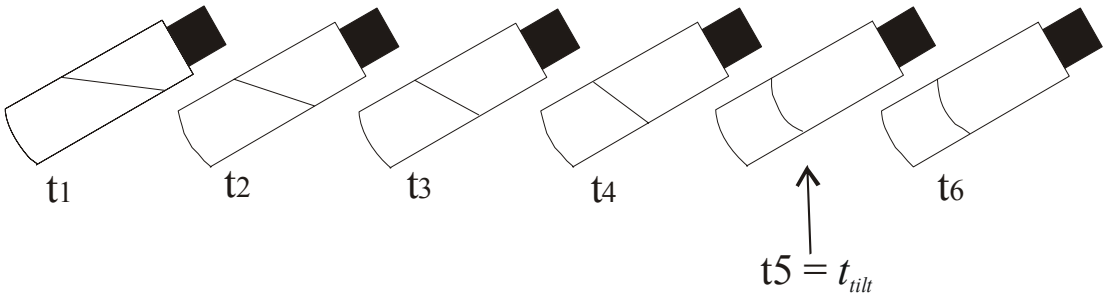


Figura 23. Esquema del procedimiento de determinación del punto gel mediante el test de inclinación. En la figura se indican diferentes tiempos de observación y la determinación del t_{tilt} *(Baeza, 2003)*.

2.5. Reología Dinámica.

Las determinaciones reológicas se realizaron en un reómetro oscilatorio dinámico Phaar Physica MCR 300 con esfuerzo de corte controlado (**Figura 24**). Se utilizó un sistema de platos parelelos (PP30/S) separados por un espacio ("gap") de 1 mm, entre los cuales se colocó aproximadamente 0,7 ml de muestra, lo que permitió llenar completamente el espacio entre ellos. La temperatura del plato inferior fue contralada mediante un sistema Peltier y un baño termostatizado (Viscotherm VT2, Phaar Physica).

Figura 24. Reómetro oscilatorio con sistema de platos paralelos.

Luego de colocada la muestra se aplicó silicona líquida con el objetivo de prevenir la evaporación de agua de la muestra y evitar la adherencia de la muestra al sistema de platos.
Las condiciones de medición fueron evaluadas en la región viscoelástica lineal y se definieron las siguientes:
(i) Frecuencia: 1 Hz.
(ii) Deformación: 0,01 %.

Durante las mediciones se registró la evolución del módulo de almacenamiento o elástico (*G'*), el módulo de pérdida o viscoso (*G''*), y la tangente del ángulo de pérdida (*tan δ*).
La *tan δ* indica el carácter viscoelástico del material y fue calculada como la relación entre la componente viscosa y la elástica (**ecuación 2**):

$$tan\,\delta = G''/G' \qquad \textbf{(ecuación 2)}$$

La transición de una estructura viscosa (sol) a una viscoelástica (gel) durante el calentamiento es determinada por el punto de cruce entre el módulo viscoso (*G''*) y el elástico (*G'*), momento en el cual el ángulo de desfasaje es de 45º y la *tan δ* es igual a 1. Luego de este punto de cruce o "punto gel" *G'* asciende notoriamente y se observa el consecuente descenso de la *tan δ*.
Según las condiciones de calentamiento, puede determinarse el tiempo de gelificación (t_{gel}) a una temperatura constante de calentamiento (usualmente superior a la temperatura de desnaturalización de la proteína) o la temperatura de transición (T_{gel}), si se registra la variación de los parámetros mediante el uso de una rampa a una baja velocidad de calentamiento.

Para todos los sistemas estudiados que incluyen soluciones de β–lg sola a diferentes pH entre 2,5 y 7, mezclas de β–lg con PGA a pH 7 y mezclas de β–lg con CMP a pH 3,5 y 7, se utilizó una rampa con baja velocidad de calentamiento.
La rampa de temperatura utilizada fue un aumento desde una temperatura inicial de 25 °C hasta 90 °C a una velocidad de 5 °C/min, se mantuvo a 90 °C durante 10 minutos, se disminuyó la temperatura de 90 °C a 25 °C a una velocidad de 25 °C/min y por último se mantuvo otros 10 minutos a 25 °C.

En algunos casos se observó que la gelificación ocurría durante la etapa de calentamiento entonces pudo obtenerse la temperatura de gelificación (T_{gel}), sin embargo hubo casos en los que el cruce de *G'* y *G''* ocurrió en la etapa de temperatura constante, entonces el parámetro obtenido fue el tiempo de gelificación (t_{gel}) a la temperatura de calentamiento.
Los valores informados son el promedio de dos determinaciones con una diferencia menor al 10 %.
Luego de terminada la medición, en los casos en que ocurría gelificación se le realizó, antes de sacar la muestra del sistema, un barrido de frecuencia a una deformación de 1 %, entre 0,01 y 10 Hz. La dependencia del módulo elástico con la frecuencia da información sobre el tipo de estructura que presenta el gel *(Stading & Hermansson, 1992)*. El grado de dependencia de *G'* con la frecuencia puede ser expresado por medio de la constante *n* según la **ecuación 3**:

$$\log G' = n \,.\, \log f + K \qquad \textbf{(ecuación 3)}$$

donde, *G'* es el modulo elástico, *f* la frecuencia de oscilación y *K* una constante.

2.6. Caracterización de la separación de fases.

Se realizaron mezclas por duplicado de diferentes concentraciones de β–lg (5, 7 y 9 % p/p) y a una concentración fija de PGA (1,25 % p/p) en tubos graduados de 15 ml, las cuales fueron centrifugadas a 3000 rpm, en una centrífuga de mesa Griffin & George (Londres, Inglaterra), a fin de asegurar la total separación de las fases. Los volúmenes de las fases separadas (V_i y V_s para volúmenes inferior y superior, respectivamente) se determinaron visualmente.
La fase inferior V_i, enriquecida en proteína, se pesó y su contenido de proteína (X_i) se determinó por el método de Kjeldhal según la *AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1995)*. Las muestras fueron sometidas a una digestión usando un sistema de calentamiento en un Digestor de Tecator AB (Höganäs, Suecia) y el contenido total de nitrógeno se determinó usando una unidad de destilación automática (Kjeltec Auto 1030 Analyzer, también de Tecator AB). La concentración final se calculó usando el factor 6,25.
El contenido de proteína de la fase superior (X_s) enriquecida en PGA se determinó por diferencia entre la proteína total de la mezcla (determinada por el método de Kjeldhal) y la determinada en la fase inferior.

Las concentraciones de polisacárido en las fase inferior rica en proteína (Y_i) y en la superior rica en polisacárido (Y_s) se calcularon en base a la siguiente ecuación que representa una recta que pasa por las coordenadas de las concentraciones iniciales de la mezcla (X_o, Y_o), por las coordenadas (X_s, Y_s) que definen la composición de la fase superior y por las coordenadas (X_i, Y_i) que definen la composición de la fase inferior y cuya pendiente queda definida por α que es la relación de volúmenes de las fases (V_i/V_s).

$$Y_{i,s} = [-(\alpha\, Y_o + Y_o)/(\alpha\, X_o + X_o)]\, \alpha\, X_{i,s} + (\alpha\, Y_o + Y_o) \qquad \textbf{(ecuación 4)}$$

2.7. Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas de las muestras se determinó por el método Biuret. Este método se basa en la medición de la absorbancia del complejo púrpura–violeta formado entre la proteína y el ión Cu^{+2} *(Gornall, Bardawill & David, 1949; Pilosof, 2000)* y posee una sensibilidad de 0,1 a 10 mg de proteína/ml *(Layne, 1957)*.

Para esta determinación se preparó una solución conteniendo 50 µl de proteína, 200 µl agua y 1000 µl de reactivo de Biuret (solución acuosa con 0,15 % de $CuSO_4$, 0,6 % de tartrato de Na y K y 30 % de NaOH al 10 %). Se midió la absorbancia de las muestras a λ = 550 nm y se las comparó con el patrón de albúmina utilizado para la calibración.

2.8. Hidrofobicidad superficial.

La hidrofobicidad superficial fue medida a 25 °C según el método de *Kato & Nakai (1980)* y *Genovese, Lajolo & Añón (2000)* usando 1–anilinonaftaleno–8–sulfonato (ANS) como sonda de fluorescencia.

La muestra de proteína se disolvió en buffer fosfato de potasio 0,1 M pH 7 a una concentración de 0,4 %, durante 30 minutos con agitación a 20 ºC. Se centrifugó a 1000 g durante 30 minutos a 15 ºC; se tomó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas por el método de Biuret. Luego se hicieron diluciones seriadas en el buffer de disolución de la muestra, en concentraciones comprendidas entre 0,1 – 0,4 % p/v.

Se midió el valor de la intensidad de fluorescencia de cada dilución excitando a λ = 365 nm y emitiendo a λ = 484 nm en un espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F–2000 (Japón).

Se midió a dos voltajes de lámpara de 400 y 700 volts, alternativa que permite variar la sensibilidad de la determinación. Luego a las mismas diluciones se le agregó 10 µl de ANS (8,0 mM en buffer fosfato 0,01 M, pH 7) y se volvió a medir el valor de la intensidad de fluorescencia en las mismas condiciones.

La intensidad relativa de fluorescencia neta para cada concentración de proteína se registró como la diferencia entre las intensidades medidas para cada solución con y sin sonda.

La hidrofobicidad superficial (H_0) de la proteína es el valor de la pendiente inicial del gráfico de intensidad relativa de fluorescencia neta en función de la concentración de la proteína (% p/v) y se calculó por análisis de regresión lineal *(Hall, 1996)*. Cada H_0 corresponde al promedio de dos repeticiones.

2.9. Determinación de las propiedades interfaciales.

Por definición, la tensión superficial se mide en la interfase gas–líquido, mientras que la tensión interfacial es medida en la interfase fluido–fluido. Ambas propiedades son determinadas usando instrumentos denominados tensiómetros superficiales o interfaciales, respectivamente. Estos tensiómetros son empleados para obtener información sobre las características de las superficies o de las interfases y las propiedades de los emulsionantes en disolución, tales como su concentración en exceso, su presión superficial, la concentración micelar crítica y la cinética de adsorción *(Carrera Sánchez, 2000; Evans & Wennerstrom, 1994; Hienenz, 1986; Hunter, 1986)*.

Existe una amplia variedad de tensiómetros; estos difieren dependiendo del principio físico en el que se basan, el diseño mecánico, de si las medidas son estáticas o dinámicas y de si son capaces de medir la tensión superficial, la interfacial, o ambas. Las medidas estáticas se realizan en superficies o interfases que se encuentran en equilibrio, mientras que las dinámicas se llevan a cabo en sistemas que no se encuentran en equilibrio *(Carrera Sánchez, 2000)*.

2.9.1. Determinación de la tensión superficial.

Los métodos empleados en este trabajo fueron:

a) Método basado en la medida de una fuerza: *Tensiómetro tipo Wilhelmy*.

b) Método dinámico basado en una medida geométrica: *Tensiómetro de gota.*

a) ***Tensiómetro Tipo Wilhelmy (determinación de isotermas presión (π) vs concentración).***

El equipo empleado para realizar las medidas de tensión superficial en el equilibrio fue un tensiómetro digital Sigma 701 (KSV, Finlandia), como el que se muestra en la **Figura 25**.

Figura 25. Fotografía del Tensiómetro de Wilhelmy.

Principio de funcionamiento.

Esta técnica posee una gran importancia debido a su universalidad, precisión y simplicidad. Se fundamenta en que las moléculas de la interfase están sujetas a un esfuerzo (tensión). Cuando un cuerpo sólido se pone en contacto con la interfase, la tensión interfacial actúa a lo largo de la línea de mojado.

En este tipo de tensiómetro se utiliza como sistema de medida una lámina de platino rectangular, suspendida verticalmente, con una geometría exactamente conocida. El borde

inferior de la lámina se pone en contacto con el líquido y de ese modo se moja. La fuerza F con que es empujada la lámina mojada hacia el líquido puede medirse (**Figura 26**).

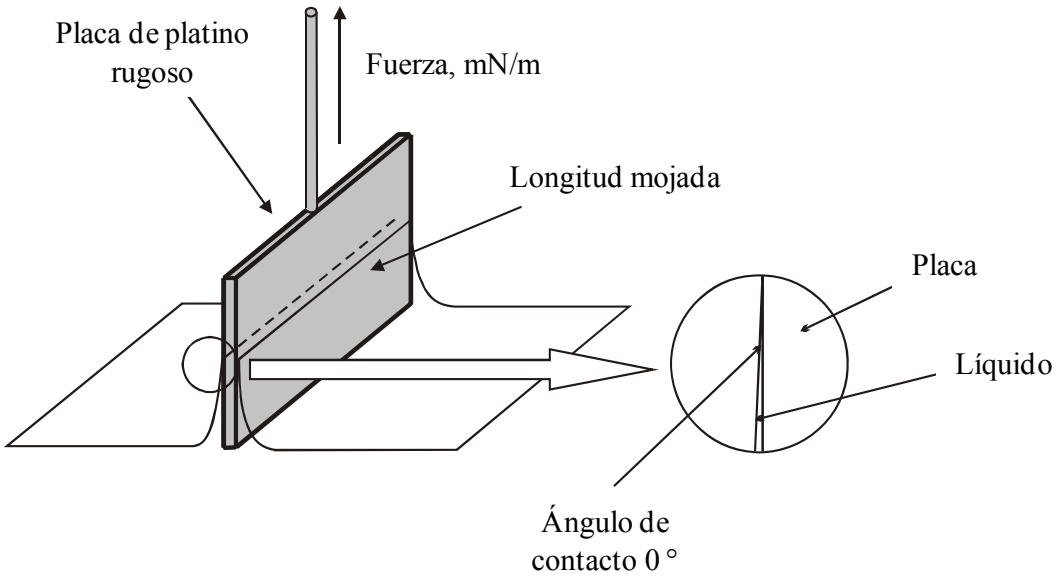


Figura 26. Placa del tensiómetro tipo Wilhelmy en posición de medida.

Si L_b es la longitud mojada, entonces la tensión superficial (σ) es (**ecuación 5**):

$$\sigma = \frac{F}{L_b.\cos\theta} \qquad \textbf{(ecuación 5)}$$

donde θ es el ángulo de contacto; es decir, el ángulo entre la superficie de la lámina y la tangente a la línea de mojado. Para medir tensiones interfaciales, la placa debe mojarse completamente por el líquido que se encuentra en un vaso o cápsula de medición.

Descripción del dispositivo experimental.

Dicho tensiómetro consta de un vaso circular, con un área de termostatización de 63,6 cm^2, donde se introduce la cápsula conteniendo la solución acuosa que se desea medir. La **Figura 27** es una representación esquemática del mismo.

La humedad en el interior del receptáculo del tensiómetro se mantiene constante mediante colocación de un recipiente con agua dentro de este. La longitud mojada de la placa de platino

está determinada por 2l + 2b, donde l, es el largo de la placa y b, su espesor. En este caso las dimensiones del plato son: l = 19,9 mm y b = 0,1 mm por lo que L_b = 40 mm.

La temperatura del sistema se mantiene constante ± 0,5 ºC, mediante circulación de agua por una camisa que rodea el recipiente de medida desde un termostato.

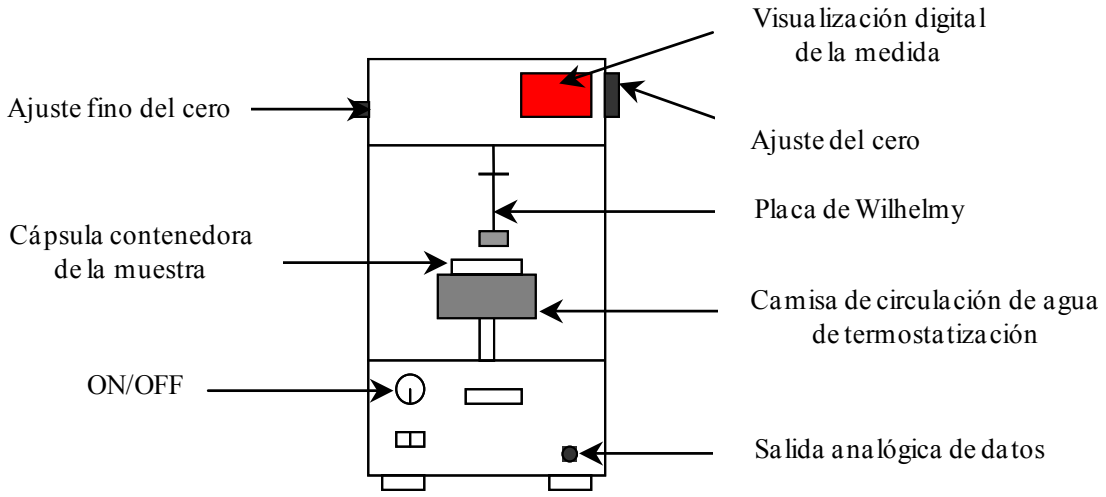


Figura 27. Esquema del Tensiómetro de Wilhelmy con sus partes constituyentes.

Procedimiento experimental.

Este equipo se ha utilizado para realizar medidas de la presión superficial de equilibrio de todas las sustancias tensioactivas empleadas y sus mezclas. Dicha presión (π_{eq}) se determina a partir de la medida de la tensión superficial (**ecuación 6**), siendo:

$$\pi_{eq} = \sigma_0 - \sigma_e \qquad \textbf{(ecuación 6)}$$

donde σ_0 es la tensión superficial de la fase acuosa en ausencia de tensioactivo y σ_e es el valor de equilibrio correspondiente a la tensión superficial cuando en la interfase acuosa hay un exceso de tensioactivo.

Para obtener los valores de equilibrio, se procedió de la siguiente forma:

Una vez preparadas las soluciones, se conservaron a 4 ºC durante 24 h con el objetivo de alcanzar el estado de equilibrio, momento en cual la tensión superficial fue medida.

Se introdujeron aproximadamente 25 ml de solución de la proteína o el polisacárido a medir o sus mezclas en el vaso de medida. En primer lugar se ajustó el cero con la placa suspendida

muy cerca del líquido. Luego, se subió la plataforma con el vaso que contiene el líquido hasta que entró en contacto con la placa, momento en el cual comenzó la medida. De esta manera se mide la tensión superficial de la subfase a la temperatura deseada que en estas experiencias se mantuvo constante a 20 ºC. Se asume que la tensión superficial alcanza el equilibrio, cuando la medida no varía más de 0,1 mN/m en 30 minutos.

La representación de la tensión superficial en función de la concentración del biopolímero en el seno de la fase es lo que se denomina isoterma de adsorción.

Como norma general, en todas las experiencias realizadas con el tensiómetro de Wilhelmy, antes de realizar cualquier medida de tensión superficial, la placa de platino se calienta a la llama de un mechero Bunsen, con el fin de eliminar cualquier impureza que pueda contaminar la superficie. Los vasos que contenían las soluciones se limpiaron cuidadosamente, usando primero una mezcla compuesta por ácido sulfúrico y peróxido–disulfato de amonio, enjuagadas con agua destilada varias veces y secadas por último a la llama del mechero.

a) Tensiómetro de Gota.

Las mediciones de tensión superficial dinámica de las películas de proteína adsorbida a la interfase aire–agua se realizaron en un tensiómetro automático de gota (Tracker, It Concept, Longessaigne, Francia) como que el que se muestra en la **Figura 28**.

Figura 28. Fotografía del tensiómetro de gota.

Principio de funcionamiento.

Los métodos de gota sésil y pendiente pueden ser empleados para determinar tensiones dinámicas superficiales o interfaciales de líquidos *(Couper, 1993; Hunter, 1986)*. La forma de una gota de líquido depende de un balance entre fuerzas gravitacionales y superficiales. Las fuerzas superficiales favorecen la forma esférica de la gota debido a que esta forma minimiza el área de contacto entre el líquido y su alrededor. Por otro lado, las fuerzas gravitacionales tienden a ocasionar una gota aplanada (si se encuentra sobre una superficie sólida) o una gota elongada (si se encuentra colgando de una superficie sólida). La forma de equilibrio adoptada por la gota está determinada por su volumen, densidad y su tensión superficial o interfacial *(McClements, 1999)*.

A continuación se describe el método de la gota pendiente, que fue el método empleado en el presente trabajo.

Mediante el método de la gota pendiente y con la ayuda del tensiómetro de gota, se puede obtener la respuesta de la tensión interfacial/superficial al someter el área de la interfase a una deformación, llevada a cabo mediante expansiones y contracciones del volumen de la gota, lo cual produce la variación de la concentración interfacial del agente tensioactivo adsorbido en la interfase, causante de esa respuesta. Esta respuesta describe el comportamiento reológico de la interfase.

El instrumento permite crear deformaciones periódicas del área de la interfase a una frecuencia fija durante ciertos períodos de tiempo, y calcula de forma automática la evolución de las propiedades viscoelásticas de la interfase con respecto al tiempo. En nuestro caso, el protocolo seguido consiste en que la oscilación sinusoidal del volumen de la gota comienza a los quince minutos de adsorción de la proteína. Transcurrido este tiempo, se somete a la gota a medidas repetidas con cinco ciclos de oscilación seguidos por otros cincuenta ciclos sin oscilación, hasta el tiempo requerido para la adsorción de la proteína. Este tipo de experiencias suele tener una duración de tres horas.

Descripción y características.

En la unidad de medida del Tracker (**Figura 29**) se pueden distinguir dos zonas principales

que se describen a continuación.

i) Dispositivo de formación de la gota: en éste se forma y se controla la gota que se encuentra dentro de la cubeta. Consta de dos partes: la primera de ellas formada por la jeringa que termina en un capilar (aguja) y su sistema de impulsión; la segunda está formada por una cubeta de vidrio y una cubierta donde se introduce ésta, que permite el control de su temperatura.

La tensión interfacial entre dos fluidos se determina mediante el análisis del perfil de una gota, formada de manera que el primer fluido se introduce en la jeringa, cuya punta queda dentro de la cubeta, que contiene al segundo fluido.

Estas dos partes quedan situadas en un dispositivo que permite realizar movimientos verticales y laterales de forma separada.

ii) Sistema óptico: incluye una fuente de luz, lentes y una cámara CCD. La gota se ilumina mediante una fuente de luz uniforme, de forma que su perfil queda registrado con la ayuda de la cámara CCD y la computadora.

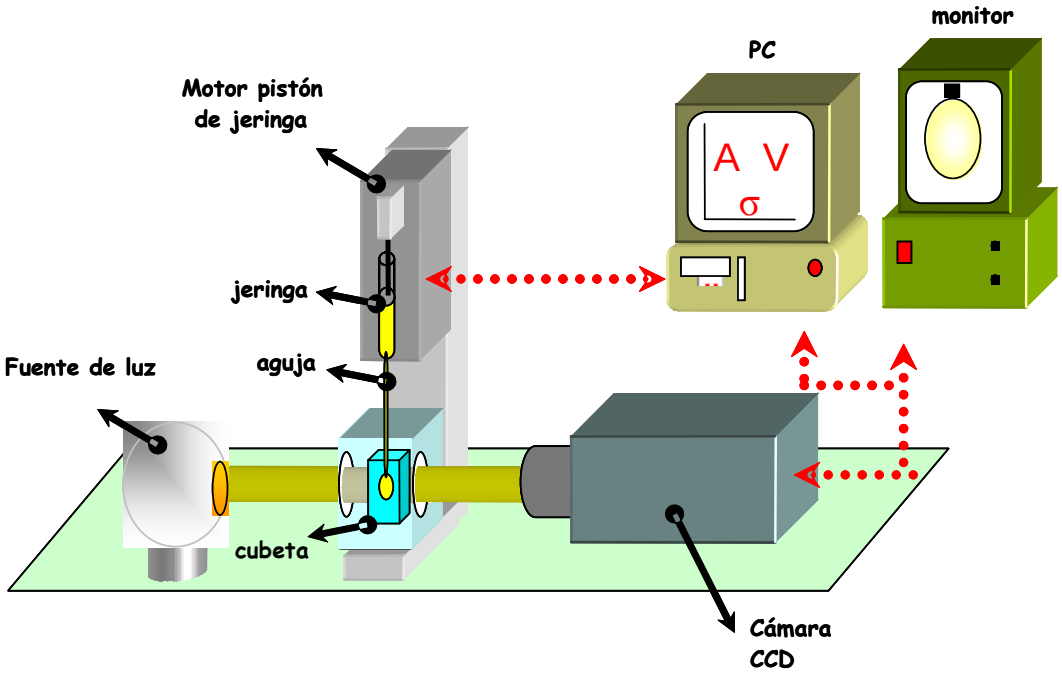


Figura 29. Esquema de los componentes y del sistema operativo del tensiómetro de gota.

Estas dos zonas principales tienen a su vez diferentes partes que se pueden configurar de diferentes maneras permitiendo al operador hacer frente a diversas condiciones para realizar las experiencias.

Configuración de la gota: en el Tracker se ha empleado la configuración de la gota pendiente para la realización de las experiencias expuestas en este trabajo. Esta se emplea cuando la densidad de la gota es mayor que la del fluido que se encuentra en el interior de la cubeta. La gota queda colgando del extremo de la aguja de la jeringa.

Jeringa y aguja: las jeringas empleadas en el Tracker son del tipo Exmire, pero se pueden emplear otras, usando adaptadores en el caso que fuera necesario.
La jeringa se coloca en una cubierta, cuya temperatura se puede controlar gracias a un baño de circulación de agua. El rango de temperatura suele oscilar normalmente entre 10 y 60 ºC.
Las puntas empleadas pueden ser rectas o curvadas hacia arriba, y pueden venir recubiertas de teflón de manera que cuando se forme la gota, ésta no se quede adherida al extremo de la aguja.

Cubeta: la cubeta es de vidrio y tiene forma de paralelepípedo, y sus medidas son 10 mm x 20 mm x 40 mm.
La cubeta se introduce en una cámara cuya temperatura también se controla con un baño de circulación de agua. El rango de temperatura oscila normalmente entre 10 y 60 ºC.

Sistema óptico: constituido por: a) eje óptico, b) fuente de luz que proporciona una iluminación uniforme a la cubeta mediante una lámpara halógena y c) lentes y cámara CCD.

Cámara de protección de la unidad de medida: esta cámara tiene sus paredes completamente oscuras y tiene la misión de proteger a la unidad de medida de las perturbaciones procedentes del exterior.

Procedimiento experimental.

Antes de la medición se procede a la limpieza de la jeringa micrométrica con la aguja en su extremo para eliminar toda impureza que pueda existir en el interior de la misma. Una vez limpia y seca, se succiona un volumen de solución correspondiente a la capacidad total de la jeringa. Posteriormente se coloca la jeringa en un soporte especialmente diseñado para mantenerla en posición vertical teniendo en cuenta que la aguja quede introducida en la

cubeta de vidrio. Se observa en la pantalla la punta de la aguja, la cual debe quedar perfectamente centrada en la parte superior del monitor.
El paso que sigue es la formación de la gota en el extremo de la aguja que puede producirse automáticamente una vez que comienza la medición, indicando en el programa la cantidad de microlitros a descargarse para su formación. Una vez formada la gota, comienza inmediatamente la adquisición de datos de tensión superficial en función del tiempo.
Una luz difusa permite la visualización de la gota, la cual es captada mediante la cámara de video. La señal de video se transmite a un procesador–digitalizador, que graba y procesa los datos geométricos de la imagen.
A partir de los 60 segundos comienzan las oscilaciones sinusoidales para la obtención de los parámetros reológicos. Estos son: el módulo dilatacional superficial (E), con sus componentes elástica (E_d) y viscosa (E_v) y el ángulo de desfase (δ) que es una medida de la viscoelasticidad relativa de la película. Estos datos se registraron a lo largo del tiempo, 12000 s y con una amplitud ($\Delta A/A$) y frecuencia angular (ω).
La computadora permite la adquisición, el análisis de imagen y la realización de los cálculos necesarios.

Determinación de la tensión superficial a partir del perfil de la gota.

Con la ayuda de la computadora y de un procesador de imágenes se puede obtener, a partir de una imagen de la gota, su perfil completo y así poder calcular el valor de la tensión superficial en un período de tiempo muy corto, y puede hacerse con una gran precisión mediante la optimización de dicho perfil mediante un sistema de ecuaciones.

El perfil de la gota se procesó de acuerdo con la ecuación de Laplace (**ecuación 7**) para obtener la tensión superficial:

$$\frac{1}{x}\frac{d}{dx}(x \cdot sen\ \phi) = \frac{2}{b} - C \cdot z \qquad \textbf{(ecuación 7)}$$

donde x y z son las coordenadas cartesianas en una posición dada del perfil de la gota, b es el radio de curvatura en el punto más bajo de la gota, ϕ es el ángulo de la tangente al perfil de la

gota y C es una constante de capilaridad, ($C = g\,\Delta\rho/\sigma$, donde σ es la tensión interfacial, $\Delta\rho$ es la diferencia entre las densidades de las dos fases y g es la aceleración de la gravedad).
El software empleado calcula tres parámetros característicos de la gota, que son área, A, volumen, V y la tensión interfacial σ. La exactitud promedio de la tensión interfacial con el equipo utilizado en este trabajo es de 0,1 mN/m. Sin embargo la reproducibilidad de los resultados se encuentra en un rango que oscila entre 0,5 y 1,5 %, la reproducibilidad mínima corresponde a temperaturas altas *(Rodríguez Patino, Rodríguez Niño & Carrera Sánchez, 1999)*.

Determinación de la velocidad de adsorción.

La cinética de adsorción de la sustancia tensioactiva (por ejemplo, proteína) sobre la interfase aire–agua se analiza a partir de los cambios de presión superficial (π) con el tiempo.
La presión superficial se define como $\pi = \sigma_0 - \sigma$, donde σ_0 es la tensión superficial de la disolución acuosa, y σ es el valor de la tensión superficial en presencia del tensioactivo. El tiempo de adsorción comienza en el momento en que se forma la gota.
La velocidad de cambio de la concentración superficial (Γ) se puede expresar como sigue *(MacRitchie, 1978)* (**ecuación 8**):

$$\left(\frac{d\Gamma}{dt}\right) = \left(\frac{d\Gamma}{d\pi}\right)\left(\frac{d\pi}{dt}\right) \qquad \textbf{(ecuación 8)}$$

Si ($d\Gamma/d\pi$) es constante, entonces ($d\pi/dt$ puede usarse para evaluar la velocidad de adsorción del tensioactivo.

Las principales etapas de la cinética de adsorción de las proteínas fueron definidas en la **Introducción** (**Figura 17**) y son las siguientes *(Graham & Philips, 1979; MacRitchie, 1978; MacRitchie, 1990; Tornberg, 1978a)*: (i) difusión de la proteína desde el seno de la fase acuosa hacia la interfase aire–agua; (ii) adsorción (penetración) y desplegamiento interfacial; y (iii) agregación (reordenamiento) en la interfase aire–agua, formación de multicapas e incluso gelificación interfacial.
En la **Figura 30** se puede observar un ejemplo de la aplicación de los métodos que se

describirán a continuación para describir cada una de estas etapas.

i) Etapa de difusión hacia la interfase:

Durante la primera etapa, a presiones interfaciales relativamente bajas (menores a 10 mN/m), que es cuando la difusión es la etapa controlante del proceso, puede emplearse una forma modificada de la ecuación de *Ward & Tordai (1946)* para correlacionar la variación de la presión interfacial con el tiempo (**ecuación 9**):

$$\pi = 2C_0KT\left(\frac{D_{dif}t}{3{,}14}\right)^{1/2} \qquad \textbf{(ecuación 9)}$$

donde C_o es la concentración en la fase acuosa; K es la constante de Boltzmann; T es la temperatura absoluta; D_{dif} es el coeficiente de difusión; y t es el tiempo de adsorción. Si la difusión es la etapa que controla el proceso de adsorción, la representación de π frente a $t^{1/2}$ será lineal *(de Feijter & Benjamins, 1987; MacRitchie, 1990; Pérez, Carrera Sánchez, Rodríguez Patino & Pilosof, 2008; Xu & Damodaran, 1994)* y la pendiente que se obtiene a partir de esta se corresponderá con la constante cinética de difusión (K_{dif}) (**Figura 30A**).
Cuando π es mayor a 10 mN/m se puede estimar la constante de difusión como la pendiente del primer punto de medición.

ii y iii) Etapas de penetración y reordenamiento interfacial:

A la hora de analizar la desnaturalización en la interfase y el reordenamiento de las moléculas de proteína adsorbidas en la interfase, se emplea la siguiente ecuación semiempírica de primer orden *(Graham & Philips, 1979; Tornberg, 1978b)* (**ecuación 10**):

$$\ln\left(\frac{\pi_{180}-\pi_t}{\pi_{180}-\pi_0}\right) = -k_i t \qquad \textbf{(ecuación 10)}$$

donde, π_{180}, π_0, y π_t son los valores de presión superficial a los 180 min de adsorción, en el momento inicial $t = 0$, y en cada momento t, respectivamente, y k_i es una constante cinética de primer orden.

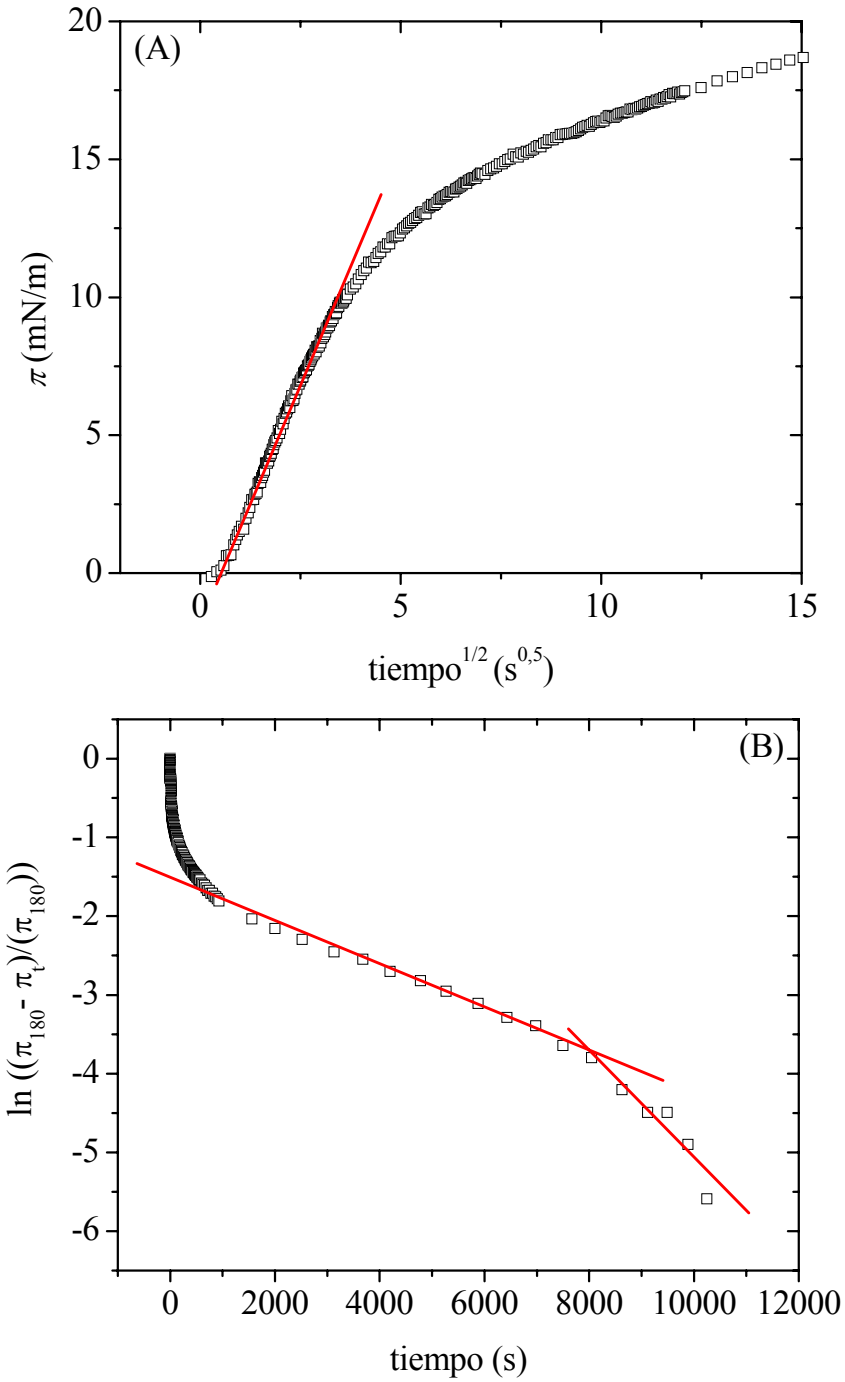


Figura 30. Etapas de adsorción de la proteína en la interfase aire–agua: (A) difusión de las moléculas de proteína hacia la interfase (**ecuación 9**) y (B) penetración y reordenamiento de las moléculas adsorbidas (**ecuación 10**).

En la práctica, una representación de dicha ecuación en función del tiempo normalmente proporciona una o más regiones lineales (**Figura 30B**). La pendiente inicial corresponde a la constante cinética de primer orden del proceso de desnaturalización/penetración (K_{ads}),

mientras que la segunda pendiente corresponde a la constante cinética de primer orden del proceso de reordenamiento (K_r), que tiene lugar en un número aproximadamente constante de moléculas previamente adsorbidas *(Graham & Philips, 1979; Suttiprasit, Krisdhasima & McGuire, 1992; Tornberg, 1978b)*. A la hora de aplicar esta ecuación, hay que tener la precaución de seleccionar un intervalo de tiempo que no se vea afectado por la difusión.

2.9.2. Determinación de las propiedades reológicas de las películas superficiales.

Las propiedades reológicas describen el comportamiento mecánico de las interfases. Estas determinaciones se realizaron también en el tensiómetro automático de gota (Tracker, It Concept, Longessaigne, Francia).

Se determinaron los parámetros viscoelásticos (tales como el módulo dilatacional superficial, E, y sus componentes elástica, E_d, y viscosa, E_v) en función del tiempo, de la amplitud de la deformación ($\Delta A/A$) y de la frecuencia de oscilación (ω). El método consiste en someter a la gota a una compresión–expansión sinusoidal controlada automáticamente, a la frecuencia y amplitud deseadas. Se determinó la variación del área (%), de manera que estuviera en la región lineal. De este modo, en todas las experiencias se mantuvo constante la amplitud y la frecuencia a 10 % y 100 mHz, respectivamente.

El método de medición comprende una serie de compresiones y expansiones periódicas sinusoidales con incremento y disminución del volumen de la gota a la amplitud deseada. El módulo dilatacional superficial se determina a través del cambio de tensión superficial, $d\sigma$, (**ecuación 11**), que resulta de un pequeño cambio sinusoidal en el área superficial de la gota, dA, (**ecuación 12**), según la **ecuación 13** *(Lucassen & Van Den Tempel, 1972)*.

$$\sigma = \sigma_0 \, sen \, (\omega . t + \delta) \qquad \textbf{(ecuación 11)}$$

$$A = A_0 \, sen \, (\omega . t) \qquad \textbf{(ecuación 12)}$$

$$E = \frac{d\sigma}{dA/A} = -\frac{d\pi}{d \ln A} \qquad \textbf{(ecuación 13)}$$

donde σ_0 y A_o son las amplitudes del esfuerzo y deformación, δ es el ángulo entre la deformación y esfuerzo y t es el tiempo.

El módulo dilatacional superficial se compone de una parte real y otra imaginaria (**ecuación 14**). La parte real del módulo, o componente de almacenamiento, es la elasticidad dilatacional superficial, $E_d = |E| \cdot cos\ \delta$. La parte imaginaria del módulo, o componente de pérdida, es la viscosidad dilatacional superficial, $E_v = |E| \cdot sen\ \delta$.

$$E = E_d + iE_v \qquad \textbf{(ecuación 14)}$$

Mediante la relación entre la componente de pérdida y la de almacenamiento puede determinarse la tangente del ángulo de pérdida (**ecuación 15**), que es el desfase de la respuesta de la tensión (o la presión) superficial respecto a la deformación que se ha realizado. Esta magnitud proporciona una idea de cuán elástico es el comportamiento de la película, de forma que si su valor es muy pequeño se considera que la película es prácticamente elástica, y por ello, la respuesta de la película será inmediata a la perturbación a la que se somete. Si por el contrario se trata de un valor alto, nos indicará que en la película hay pérdida de energía suministrada, por lo cual no responderá tan rápidamente a la perturbación externa. En estos casos, se asocia a la película un comportamiento viscoso en cierto grado, que depende del valor del ángulo de pérdida.

$$tan\ \delta = E_v / E_d \qquad \textbf{(ecuación 15)}$$

Para un material perfectamente elástico el esfuerzo y la deformación están en fase (δ = 0 º), y el término de la parte imaginaria del módulo es cero. En este caso, la tangente del ángulo de pérdida ($tan\ \delta$) es cero. En el caso de un material perfectamente viscoso, δ = 90 º, la parte real del módulo es cero y $tan\ \delta$ = 1.

Todas las mediciones en este equipo fueron realizados a una temperatura de 20 ºC, la cual se mantuvo constante con una variación de 0,1 ºC por circulación de agua desde un baño termostatizado.

Concluida la medición, se retiró la jeringa, se descartó la solución y se procedió con el protocolo de limpieza que consta de repetidos lavados de la jeringa con etanol y finalmente con hexano.

Mediante esta técnica se estudiaron las propiedades interfaciales de proteínas solas, de mezclas de proteínas, de polisacáridos solos y de mezcla de proteínas y polisacáridos.

Las mediciones de β–lg y sus mezclas con CMP se llevaron a cabo a pH 7 (en buffer Trizma). El CMP además de a pH 7 se midió a pH 5 en buffer acetato. Las concentraciones de CMP estudiadas fueron: 10^{-2}, 0,5 y 4 % p/p, mientras que las mediciones de β–lg se hicieron sólo al 4 % p/p. Las mezclas entre ambas se estudiaron en una relación CMP:β–lg igual a 25:75, 50:50 y 75:25, con una concentración total de proteína del 4 % p/p.

Las mediciones de polisacáridos y sus mezclas con CMP se realizaron a pH 7 (en buffer Trizma). La concentración de polisacárido en la mezcla fue de 0,5 % p/p y la de CMP de 4 % p/p.

La calidad del agua desionizada se mide según su resistividad. El agua utilizada se obtuvo mediante una unidad Millipore (Milli–Q) y su resistividad fue de 18 MΩ·cm.

3. Referencias.

AOAC, ed (1995). *Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis*. Arlington: AOAC Press.

Baeza, R. (2003). Interacciones entre β-lactoglobulina y polisacáridos en coloides alimentarios. *Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. PhD* (p. 253). Buenos Aires, Argentina.

Bollag, D. M., & Edelstein, S. J. (1991). Gel electrophoresis under denaturing conditions. En: D. M. Bollag, & S. J. Edelstein, *Protein Methods* (pp. 95-141). New York: Wiley-Liss, Inc.

Carrera Sánchez, C. (2000). Estructura, estabilidad, morfología y características reológicas de películas de emulsionantes alimentarios (lípidos y proteínas) esparcidas sobre la interfase aire-agua. *Departamento de Ingeniería Química*, vol. PhD (p. 548). Sevilla: Facultad de Química, Universidad de Sevilla.

Class, S. D., Dalton, C. R., & Hancock, B. C. (1999). Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *Pharmacology Science and Technology Today*, *2*(8), 311-319.

Couper, A. (1993). *Physical Methods of Chemistry*. New York: John Wiley & Sons.

de Feijter, J. A., & Benjamins, J. (1987). Adsorption kinetics of proteins at the air-water interface. En: E. Dickinson, *Food emulsions and foams* (pp. 72-85). London: Royal Society of Chemistry.

Etzel, M. R. (1999). Production of κ-casein macropeptide for nutraceutical uses. vol. 5,968,586. United States.

Evans, D. F., & Wennerstrom, H. (1994). *The colloidal domain: where physics, chemistry, biology and technology meet*. New York, USA: VCH Publishers.

Genovese, M. I., Lajolo, F. M., & Añón, M. C. (2000). Determinación de hidrofobicidad. En: A. M. R. Pilosof, & G. B. Bartholomai, *Caracterización funcional y estructural de proteínas* (pp. 169-173). Buenos Aires, Argentina: Eudeba.

Gornall, A. J., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, *177*, 751-766.

Graham, D. E., & Philips, M. C. (1979). Proteins at liquid interfaces: II. Adsorption isotherms. *Journal of Colloid and Interface Science*, *70*, 415-426.

Hall, G. M. (1996). Basic concepts. En: G. M. Hall, *Methods of testing protein functionality* (pp. 1-10). London, UK: Blackie Academic & Professional.

Haque, Z. U., Casay, G. A., Wilson, W. W., Antila, P., & Antila, V. (1993). Effect of casein hydrolyzates on association properties of milk proteins as seen by dynamic light scattering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *41*(2), 203-207.

Haque, Z. U., & Sharma, M. (1997). Thermal gelation of β-lactoglobulin AB purified from cheddar whey. 1. Effect of pH on association as observed by dynamic light scattering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 2958-2963.

Hienenz, P. C. (1986). *Priciples of colloids and surfaces chemistry*. New York, USA: Marcel Dekker.

Hunter, R. J. (1986). *Foundations of Colloids Science*. Oxford, UK: Oxford University Press.

Kato, A., & Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, *624*(1), 13-20.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophague T4. *Nature*, *227*, 680-687.

Layne, E. (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in Enzymology*, *10*, 447-455.

Lucassen, J., & Van Den Tempel, M. (1972). Dynamic measurements of dilational properties of a liquid interface. *Chemical Engineering Science*, *27*(6), 1283-1291.

MacRitchie, F. (1978). Proteins at interfaces. *Advances in Protein Chemistry*, *32*, 283-326.

MacRitchie, F. (1990). *Chemistry at interfaces*. San Diego, CA: Academic Press.

Malvern-Instruments Dynamic light scattering: an introduction in 30 minutes. *Technical Note*, *www.malvern.co.uk*, 1-8.

McClements, D. J. (1999). Interfacial properties and their characterization. En: D. J. McClements, *Food emulsions: principles, practice and techniques* (pp. 127-160). Florida, USA: CRC Press.

Mie, G. (1908). Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions. *Annalen der Physik*, *25*(3), 377-345.

Nakano, T., Ikawa, I., & Ozimek, L. (2007). Detection of sialylated phosphorylated κ-casein glycomacropeptide electrophoresed on polyacrylamide gels and cellulose acetate strips by

the thiobarbituric acid and malachite green dye reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 2714-2726.

Pérez, O. E., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2008). Dynamics of adsorption of hydroxypropyl methylcellulose at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, *22*, 387-402.

Pilosof, A. M. R. (2000). Solubilidad. En: A. M. R. Pilosof, & G. B. Bartholomai, *Caracterización funcional y estructural de proteínas* (pp. 31-40). Buenos Aires, Argentina: Eudeba.

Relkin, P. (1994). Differential scanning calorimetry: a useful tool for studying protein denaturation. *Thermochimica Acta*, *246*, 371-386.

Relkin, P., Meylheuc, T., Launay, B., & Raynal, K. (1998). Heat-induced gelation of globular protein mixtures. A DSC and scanning electron microscopic study. *Journal of Thermal Analysis*, *51*, 747-755.

Rodríguez Patino, J. M., Rodríguez Niño, M. R., & Carrera Sánchez, C. (1999). Adsorption of whey protein isolate at the oil-water interface as function of processing conditions: a rheokinetic study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 3640-3648.

Ross, Y., & Karel, M. (1991). Phase transitions of mixtures of amorphous polysaccharides and sugars. *Biotechnology Progress*, *7*, 49-53.

Silva-Hernández, E., Nakano, T., & Ozimek, L. (2002). Isolation and analysis of κ-casein glycomacropeptide from goat sweet whey. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 2034-2038.

Silva-Hernández, E., Nakano, T., Verdalet-Guzmán, I., & Ozimek, L. (2004). Comparison of glycomacropeptide isolated from raw and pasteurized goat milk. . *Milchwissnschaft*, *59*, 27-31.

Stading, M., & Hermansson, A. M. (1992). Inhomogeneous fine-stranded β-lactoglobulin gels. *Food Hydrocolloids*, *5*, 455-470.

Stepanek, P. (1993). Data analysis in light scattering. En: W. Brown, *Dynamic light scattering. The Methods and Some Applications* (pp. 177-241). London, UK: Clarendon Press.

Suttiprasit, P., Krisdhasima, V., & McGuire, J. (1992). The surface activity of α-lactalbumin, β-lactoglobulin, and bovine serum albumin. *Journal of Colloid and Interface Science*, *154*(2), 316-326.

Tornberg, E. (1978a). The applacation of the drop volume technique to measurements of the adsorption of proteins at interfase. *Journal of Colloid and Interfase Science*, *64*, 391 - 402.

Tornberg, E. (1978b). The applacation of the drop volume technique to measurements of the adsorption of proteins at interfase. *Journal of Colloid and Interfase Science*, *64*, 391-402.

Ward, A. F. H., & Tordai, L. (1946). Time-Dependence of Boundary Tensions of Solutions I. The Role of Diffusion in Time-Effects. *The Journal of Chemical Physics*, *14*(7), 453-461.

Xu, S., & Damodaran, S. (1994). Kinetics of adsorption of protein at the air-water interface from a binary mixture. *Langmuir*, *10*, 472-480.

Resultados

Los resultados de este trabajo se dividirán en dos secciones, la primera estudiará el comportamiento de los sistemas CMP–β–lg y la segunda el de los sistemas proteína–polisacárido, ya sea β–lg–polisacáridos como CMP–polisacáridos.

A su vez, cada sección estará dividida en tres capítulos que describirán los estudios en diferentes coloides alimentarios:

i) el **Capítulo 1** describirá las interacciones en solución,
ii) el **Capítulo 2** el impacto de las interacciones en geles,
iii) el **Capítulo 3** el impacto de las interacciones en interfases.

SECCIÓN I

Interacciones entre β–lg y CMP

Objetivo.

El objetivo de esta sección fue estudiar las interacciones a nivel molecular entre β–lg y CMP en solución y su impacto en la formación de geles e interfases.

¿Por qué es importante estudiar las interacciones de los sistemas mixtos CMP:β–lg?

i) **porque ambos componentes están juntos en el suero de queso.** El CMP es un glicopéptido hidrofílico liberado a partir de la acción de la quimosina sobre la κ–caseína durante el proceso de elaboración del queso. La fracción insoluble de κ–caseína permanece en las micelas de caseína mientras que el CMP se recupera en el suero junto con todas las proteínas presentes en el suero lácteo *(El-Salam, El-Shibiny & Buchheim, 1996; Martin Diana, Fraga & Fontecha, 2002)*.

ii) **porque el CMP está presente en el suero en concentraciones apreciables.** Como se mencionó en la **Introducción**, luego de la β–lg y la α–la, el CMP es el componente proteico más abundante en el suero de queso con concentraciones que alcanzan el 15 – 20 % del total de las proteínas *(Oakenfull, Pearce & Burley, 1997; Thomä-Worringer, Sørensen & López Fandiño, 2006)*.

iii) **porque el CMP siempre fue despreciado dentro de la composición de las proteínas del suero.** No existen referencias en la literatura que indiquen la influencia de la presencia de CMP en el suero, aún cuando está presente en concentraciones importantes.

iv) **porque no se sabe mucho acerca del CMP.** Los conocimientos acerca del CMP hasta la actualidad son pocos y contradictorios *(Minkiewicz, Slangen, Lagerwerf, Haverkamp, Rollema & Visser, 1996; Thomä-Worringer et al., 2006; Thöma Worringer, Siegert & Kulozik, 2007)*.

Referencias.

El-Salam, M. H. A., El-Shibiny, S., & Buchheim, W. (1996). Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. *International Dairy Journal*, *6*(4), 327-341.

Martin Diana, A. B., Fraga, M. J., & Fontecha, J. (2002). Isolation and characterization of caseinmacropeptide from bovine, ovine, and caprine cheese whey. *European Food Research and Technology*, *214*, 282-286.

Minkiewicz, P., Slangen, C., Lagerwerf, F., Haverkamp, J., Rollema, H., & Visser, S. (1996). Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of bovine κ-casein macropeptide and characterization of isolated fractions. *Journal of Chromatography A*, *743*, 123-135.

Oakenfull, D., Pearce, J., & Burley, R. W. (1997). Protein gelation. En: S. Damodaran, & A. Paraf, *Food protein and their applications*. New York: Marcel Dekker, Inc.

Thomä-Worringer, C., Sørensen, J., & López Fandiño, R. (2006). Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *International Dairy Journal*, *16*, 1324-1333.

Thöma Worringer, C., Siegert, N., & Kulozik, U. (2007). Foaming properties of caseinomacropeptide - 2. Impact on pH and ionic strenght. *Milchwissenschaft*, *62*(3), 253-255.

SECCIÓN I

Capítulo 1

Interacciones entre β–lg y CMP en solución acuosa

I.1. Interacciones CMP–β–lg en solución.

A fin de estudiar el comportamiento de mezclas de β–lg y CMP en solución, se caracterizó en primer lugar el comportamiento de cada componente solo en relación a las variables de interés: pH, concentración y tratamiento térmico (hasta 85 °C).
Las condiciones elegidas fueron las siguientes:

- ✓ La β–lg fue estudiada a una concentración entre 3 y 20 % p/p y en el rango de pH 2 – 7.
- ✓ El CMP fue evaluado a dos concentraciones (3 y 5 % p/p) y en el rango de pH 3 – 6,5.
- ✓ Los sistemas mixtos CMP:β–lg estudiados fueron: 25:75, 50:50, 75:25 a una concentración total de proteína del 4 % p/p y a pH 3,5 y 7 (condiciones elegidas a partir de los estudios realizados en los componentes solos).

En este punto es importante tener claro ciertos conceptos que servirán para la comprensión de este capítulo.

Autoensamblaje (o "self assembly"): es una organización (asociación) espontánea y reversible de moléculas por medio de interacciones no covalentes, es decir, puente hidrógeno, hidrofóbicas, van der Waals, electrostáticas. Algunos ejemplos de este tipo de asociación son las formaciones de micelas, de cristales de lípidos y de monocapas.

Asociación: son cambios a nivel molecular caracterizados por uniones débiles entre sitios específicos de unión, por ejemplo formación de monómeros, dímeros.

Agregación: es el término general que describe diferentes tipos de interacciones proteína–proteína promovidas por factores externos como temperatura que puede involucrar uniones covalentes y puede entonces ser irreversible.

I.1.1. Caracterización de la asociación/agregación de β–lg por DLS.

I.1.1.1. Efecto de la concentración sobre el estado de asociación de β–lg.

La **Figura I.1.1** muestra el efecto de la concentración de β–lg (de la firma Besnier & Bridel) en la distribución de tamaño de partícula por intensidad a temperatura ambiente y pH 7. Se observa que las soluciones de concentraciones menores a 12 % p/p presentan un comportamiento monomodal encontrándose el *d(H)* entre 2,5 y 16 nm. La solución de β–lg al

12 % p/p presenta un comportamiento bimodal, con una población en valores menores a 10 nm y otra en tamaños mayores (aproximadamente 100 nm). Para las concentraciones mayores (15 y 20 % p/p) se observa nuevamente un comportamiento monomodal, como para las concentraciones más pequeñas, pero en este caso el único pico presente se encuentra en tamaños mucho más grandes, entre 100 y 2600 nm.

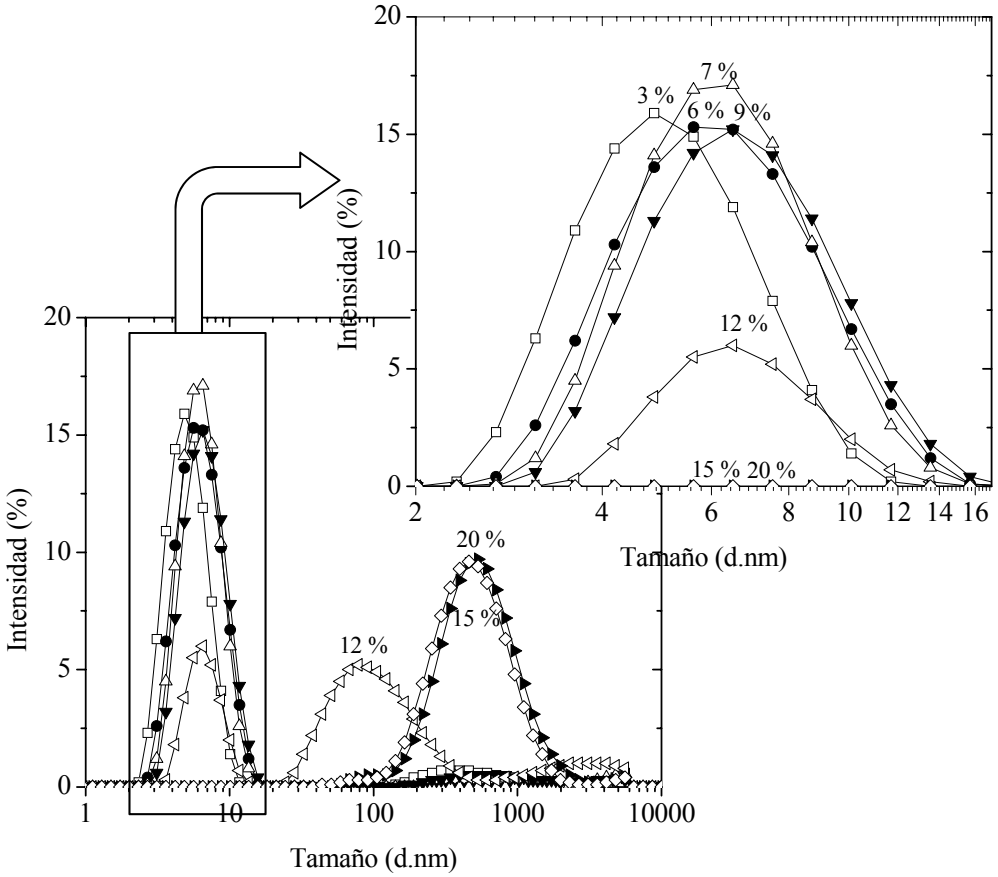


Figura I.1.1. Distribución de tamaño de partícula por intensidad y zoom del primer pico de la distribución de soluciones de β–lg. Concentración (% p/p): (□) 3, (●) 6, (△) 7, (▼) 9, (◁) 12, (▶) 15, (◇) 20. Temperatura 25 °C, pH 7.

Inserto en la **Figura I.1.1** se muestra, ampliado, el pico correspondiente a los menores tamaños con el objetivo de mostrar en detalle la posición de ese pico para las diferentes concentraciones de β–lg. Se observa que a concentraciones entre 6 y 12 % p/p la proteína presentó un pico con un valor máximo entre 5 y 6 nm de diámetro. Este diámetro corresponde a su forma dimérica (36,8 kDa), lo que está de acuerdo con lo reportado en investigaciones previas *(Gimel, Durand & Nicolai, 1994; Griffin & Griffin, 1993; Harnsilawat,*

Pongsawatmanit & McCelments, 2006; Hoffmann & van Mil, 1999; Mc Kenzie & Sawyer, 1967; Mulvihill & Donovan, 1987). Sin embargo, en este pico también están incluidos monómeros (4 nm), trímeros (6,3 nm) y tetrámeros (7 nm) de β–lg. A pH neutro y 25 °C, la β–lg en solución existe en equilibrio dinámico entre su forma dimérica, en la cual los monómeros están unidos no covalentemente, y su forma monomérica *(Aymard, Durand & Nicolai, 1996; Mc Kenzie, 1971; Verheul, Pedersen, Roefs & de Kruif, 1999)*. Además *Verheul et al. (1999)* encontró, a altas concentraciones (> 3 % p/p) y a pH 6,9, estructuras más grandes que dímeros, por técnica de dispersión de neutrones en ángulo pequeño.

Por otro lado, la posición del valor máximo del pico de la solución de β–lg al 3 % p/p se desplazó a tamaños menores, evidenciando la presencia de más forma monomérica a menor concentración. *Mehalebi, Nicolai & Durand (2008)* también encontraron una disminución del *d(H)* a concentraciones menores de β–lg. Ellos mostraron que a pH 7 y concentraciones menores a 5 % p/p las interacciones podrían despreciarse ya que el peso molecular y el diámetro hidrodinámico que encontraron para dichas soluciones corresponden a la forma monomérica de β–lg (18,4 kDa y 4 nm, respectivamente). En la **Figura I.1.1** se observa además, que al aumentar la concentración desde 3 a 6 – 12 % p/p, la cola del pico se mueve a tamaños mayores (de 10 – 11 nm a 14 – 17 nm).

Al analizar estos resultados mediante la distribución por volumen (**Figura I.1.2**) encontramos que las estructuras asociadas de 100 nm presentes en la muestra de β–lg 12 % p/p (**Figura I.1.1**) son despreciables cuantitativamente ya que en volumen sólo se observa el pico en los tamaños menores a 10 nm. Mientras que para las concentraciones 15 y 20 % p/p se confirma que la mayoría de la proteína se encuentra asociada en grandes oligómeros.

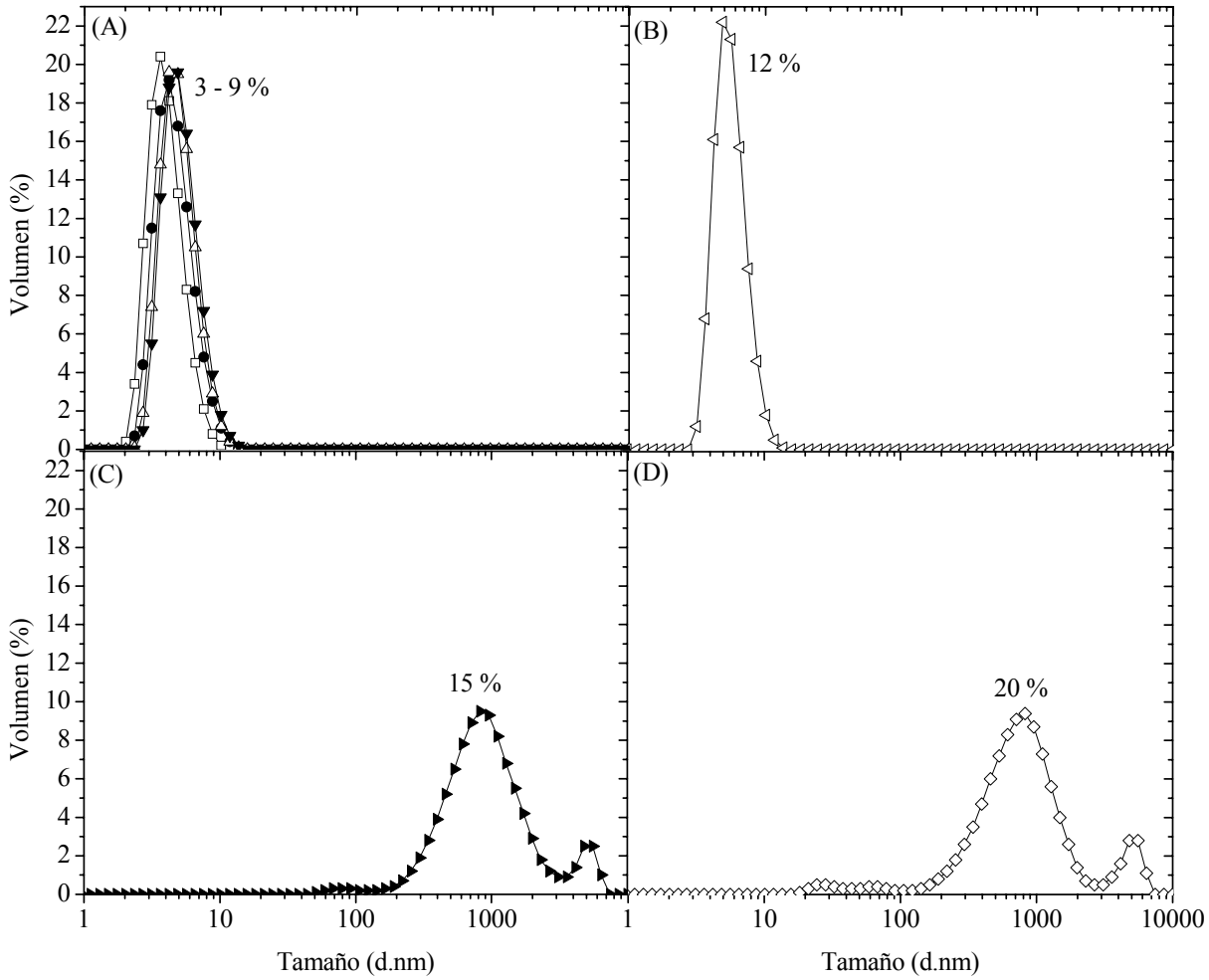


Figura I.1.2. Distribución de tamaño de partícula por volumen de soluciones de β–lg. Concentración (% p/p): (A): (□) 3, (●) 6, (△) 7 y (▼) 9, (B): (◁) 12, (C): (▶) 15 y (D): (◇) 20. Temperatura 25 °C, pH 7.

Esta tendencia a la asociación dependiente de la concentración se evidencia también en el análisis de Cumulantes, mostrado en la **Figura I.1.3**, donde se observa el aumento del *d(H)* promedio con el incremento de la concentración de proteína. Se observó un notable incremento de dicho valor con el aumento de la concentración. Para las concentraciones más altas estudiadas (15 y 20 % p/p) se obtuvieron valores de *d(H)* promedio de más de 300 nm. Esta tendencia a la asociación con la concentración fue observada también por *Mehalebi et al. (2008)* y *Hoffmann, Roefs, Verheul, van Mil & de Kruif (1996)*.

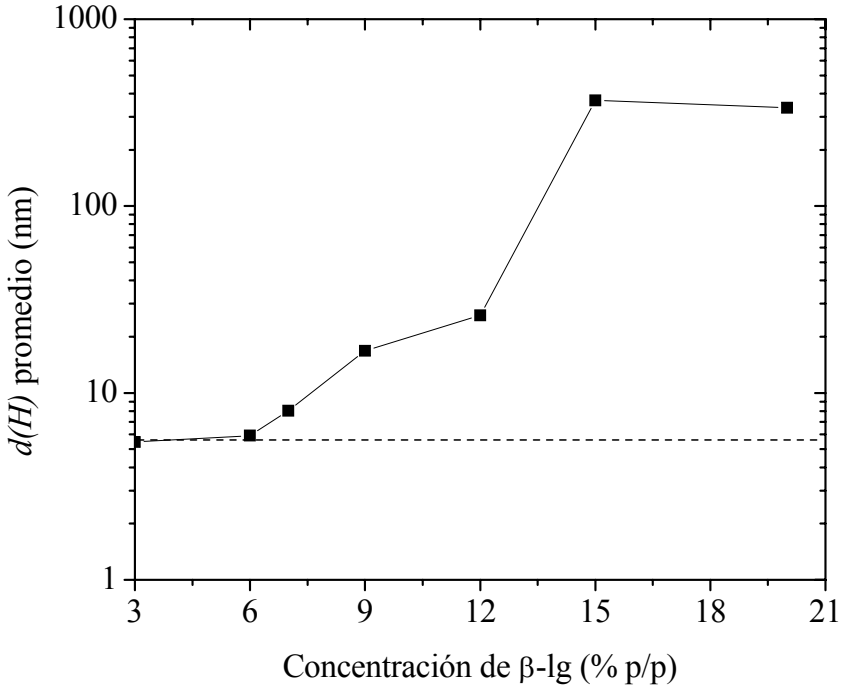


Figura I.1.3. Dependencia del *d(H)* promedio con la concentración de β–lg. Con línea punteada se indica el valor del diámetro de la proteína en forma dimérica. Temperatura 25 °C, pH 7.

A partir de los resultados obtenidos, se decidió seleccionar las concentraciones menores (3, 6, 7 y 9 % p/p) para estudiar las etapas tempranas de la agregación por tratamiento térmico.

I.1.1.2. Efecto del tratamiento térmico en la agregación de β–lg.

En la **Figura I.1.4** se muestra la distribución por intensidad y volumen al final del calentamiento (85 °C) en comparación con la distribución a temperatura ambiente (25 °C) para soluciones de β–lg (de Besnier & Bridel) al 3 y 6 % p/p a pH 7 a modo de ejemplo. Las distribuciones de la solución de β–lg al 7 y 9 % p/p no se muestran porque fueron semejantes a la solución al 6 % p/p, aunque la del 9 % p/p presentó algunos errores para las temperaturas más altas porque se forman agregados más grandes que dispersan la luz con mayor intensidad. A 25 °C se observa una única población con diámetro hidrodinámico entre 2 y 15 nm con un máximo de pico entre 4 – 6 nm dependiendo de la concentración, como fue analizado en la **Figura I.1.1**.

Al aumentar la concentración de β–lg de 3 a 6 % p/p, el tratamiento térmico hasta 85 °C indujo la formación de cantidades crecientes de agregados como se observa en la distribución de tamaño multimodal con picos en tamaños mayores a 10 nm.

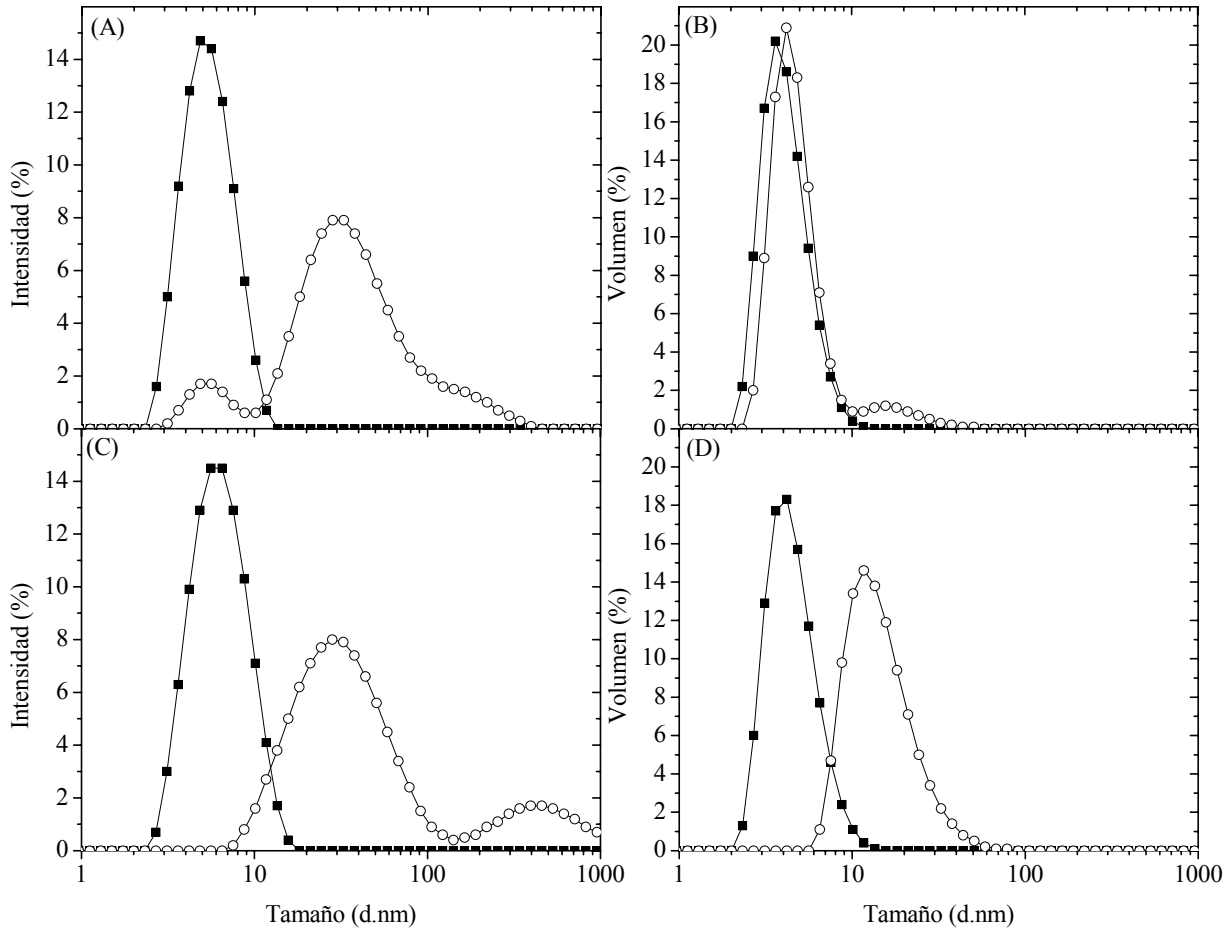


Figura I.1.4. Distribución de tamaño de partícula por intensidad (A, C) y volumen (B, D) de β–lg. Concentración (% p/p): 3 (A y B) y 6 (C y D). Temperatura (°C): (■) 25, (○) 85.

La distribución de tamaño de partícula por intensidad de la solución de β–lg 3 % p/p a 85 °C (**Figura I.1.4A**) mostró un comportamiento bimodal con un pico de menor intensidad en los tamaños más chicos y un pico de mayor intensidad con valores mayores de *d(H)* (de 10 a 200 nm). Pero cuando se analizó la distribución de tamaño de partícula por volumen (**Figura I.1.4B**) se observó que el pico correspondiente a los tamaños mayores (mayoritario en intensidad) casi desapareció indicando que el número de agregados es muy pequeño; sin embargo, a pesar de que son pocos, estos grandes agregados influyen en la intensidad de luz dispersada porque la intensidad es proporcional al cuadrado del peso molecular. En la **Figura**

I.1.4B se observó entonces que la mayoría de la proteína permanece en forma monomérica/dimérica.

En la distribución por intensidad de la solución β–lg 6 % p/p a 85 °C (**Figura I.1.4C**) se observa que el pico de menor tamaño casi desapareció. A diferencia de lo visto para la concentración 3 % p/p, en este caso los agregados de 10 – 100 nm observados en la distribución de tamaño de partícula por intensidad persisten en la distribución por volumen, no observándose más el pico correspondiente al dímero de β–lg (**Figura I.1.4D**). Esto indica el importante efecto de la concentración en la formación de agregados.

La temperatura a partir de la cual se observó la formación de agregados coincidió con la temperatura de inicio de desnaturalización (T_o) de β–lg obtenida por DSC (**Figura I.1.5**) como se mostrará más adelante.

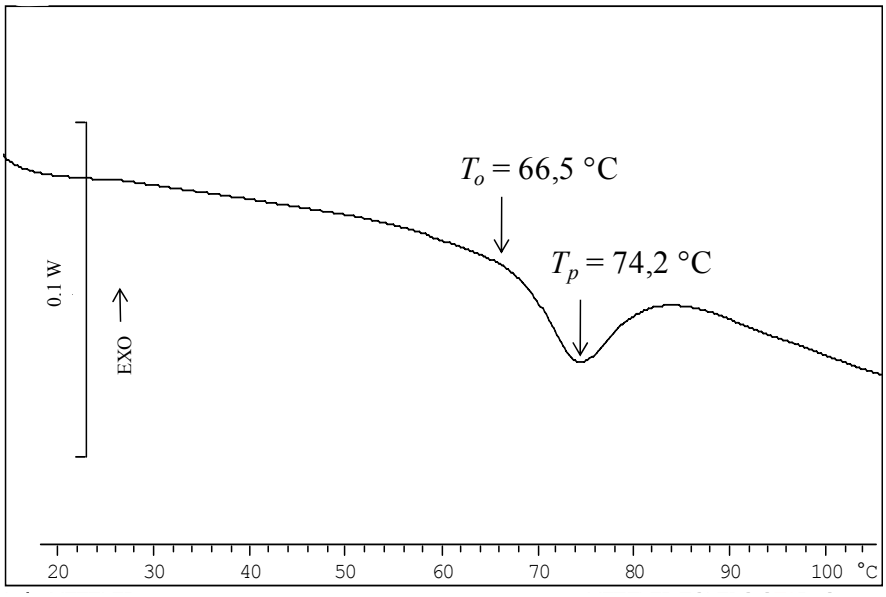


Figura I.1.5. Termograma de β–lg a pH 7 (15 % p/p).

Las transiciones térmicas mostradas en dicha figura coinciden con las reportadas en trabajos previos *(Baeza & Pilosof, 2002; de Wit, 2009; de Wit & Klarenbeek, 1981; Relkin, 1996; Relkin, Launay & Liu, 1998)*.

El cambio de la distribución en el tamaño de partícula a partir de la temperatura de desnaturalización evidencia que a este pH (7) los agregados se forman a partir de los grupos expuestos luego de desnaturalizada la proteína.

La agregación de β–lg inducida por calor a pH neutro se puede describir como un mecanismo de reacción de dos etapas: la desnaturalización seguida por reacciones de agregación irreversibles. Las condiciones experimentales determinan la velocidad y la naturaleza de las reacciones *(Verheul, Roefs & de Kruif, 1998)*.

Se sabe que bajo calentamiento, la β–lg sufre cambios en la estructura cuaternaria y terciaria. El primer cambio es la disociación del dímero de β–lg nativo en monómeros, proceso que fue ampliamente estudiado por *Aymard, Durand & Nicolai (1996)*. El segundo cambio corresponde al desplegamiento parcial del monómero de β–lg, de modo que el grupo sulfhidrilo libre y los residuos hidrofóbicos quedan expuestos al solvente, resultando en un monómero reactivo *(Creamer et al., 2004; Hoffmann & van Mil, 1997; Manderson, Hardman & Creamer, 1999; Relkin, 1998; Surroca, Haverkamp & Heck, 2002; Vetri & Militello, 2005)*. Con el aumento de la temperatura, hay un menor grado de ordenamiento del agua alrededor de los residuos hidrofóbicos, lo cual favorece las interacciones hidrofóbicas *(Wodak, De Crombrugghe & Janin, 1987)*. *Sharma, Haque & Wilson (1996)* explicaron que esta razón es quizás la que provoca la asociación progresiva que se ha observado cuando se expone a la β–lg a un calentamiento hasta la temperatura de desnaturalización. La cinética de formación de agregados de β–lg mediante interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro fue ampliamente estudiada por *Galani & Apenten (1999)* y *Apenten & Galani (1999)*.

La **Figura I.1.6** muestra la distribución en intensidad y volumen de una solución de β–lg 6 % p/p en diferentes etapas del proceso de calentamiento con el objetivo de mostrar la evolución del proceso de agregación. En dicha figura no se grafican todas las temperaturas medidas (de 25 a 85 °C cada 5 °C) porque entre 25 y 60 °C no ocurrió ningún cambio visible ni en la distribución por intensidad ni en la distribución por volumen, por eso se pone a modo de ejemplo la de 25 °C. A partir de que la solución alcanza los 65 °C comienzan a ocurrir cambios en la distribución, por esta razón a partir de dicha temperatura se grafican todas las temperaturas analizadas hasta el final del calentamiento.

En la distribución de tamaño de partícula por intensidad (**Figura I.1.6A**) se puede observar que a 65 °C, temperatura de inicio de desnaturalización (T_o), el pico correspondiente a la β–lg dimérica comienza a decrecer su intensidad, y luego de pasar los 75 °C este pico desaparece tanto en la distribución por intensidad (**Figura I.1.6A**) como en la distribución por volumen (**Figura I.1.6B**), aumentando el pico correspondiente a agregados pequeños (20 – 30 nm). La

desaparición aparente de la β–lg monomérica/dimérica ocurre casi completamente a la temperatura de pico de desnaturalización (T_p) de β–lg (**Figura I.1.5**).

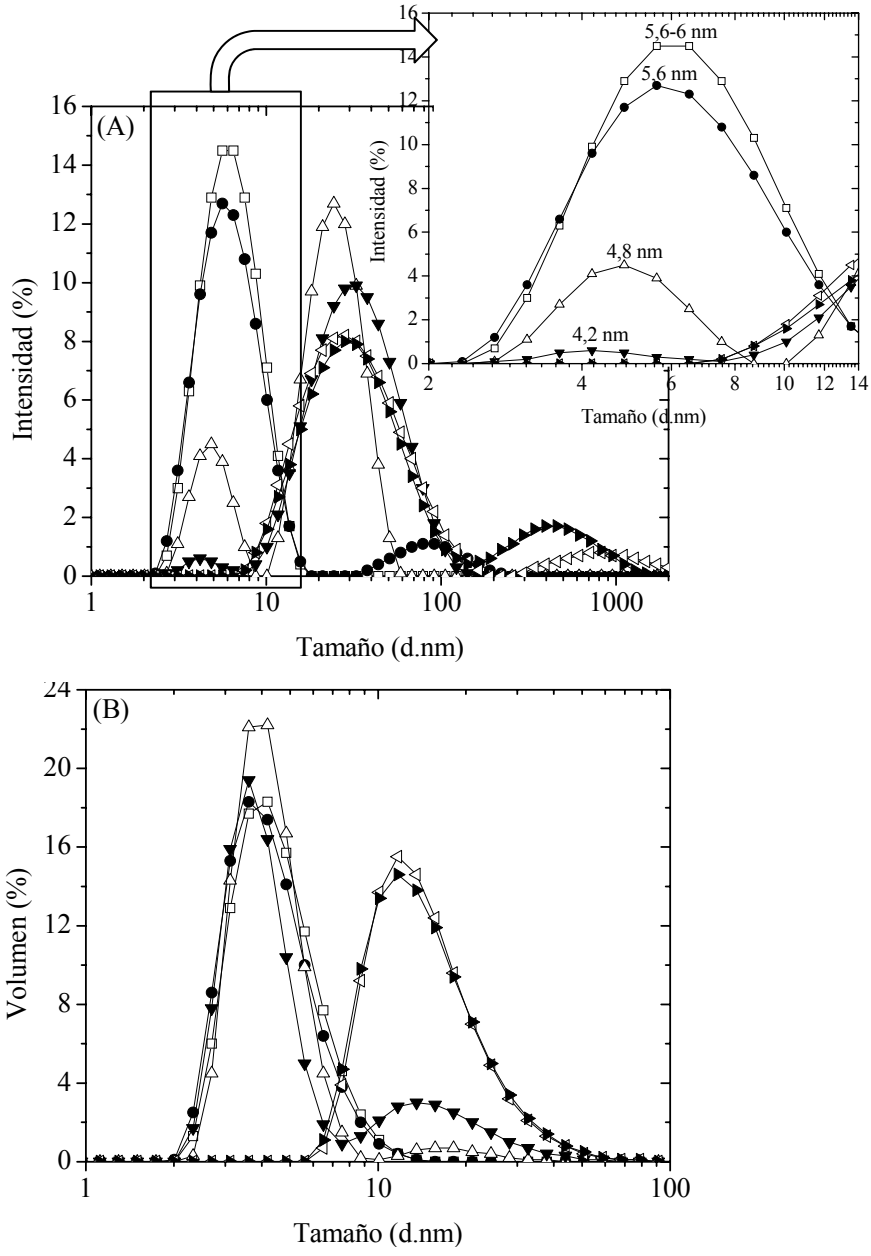


Figura I.1.6. Distribución de tamaño de partícula por intensidad (A) y volumen (B) de soluciones de β–lg al 6 % p/p a pH 7. Gráfico inserto en (A): zoom del primer pico de la distribución por intensidad. Temperatura (°C): (□) 25, (●) 65, (△) 70, (▼) 75, (◁) 80, (▶) 85.

Hoffmann et al. (1997) midieron los perfiles de elución de soluciones de β–lg 0,5 % p/p por cromatografía de exclusión molecular con detección de dispersión de luz laser multiángulo

(SEC–MALLS) y obtuvieron un único pico con un PM promedio de 27 ± 2 kDa, en una solución sin calentamiento previo, lo cual indica la presencia de β–lg monomérica–dimérica. Luego del calentamiento (hasta 65 °C), observaron la disminución del pico correspondiente a la β–lg nativa, y la aparición de un pico que se puede atribuir a los agregados. *Schokker, Singh, Pinder, Norris & Creamer (1999)* también encontraron este comportamiento por SEC–MALLS y técnicas electroforéticas. *Le Bon et al. (1999)* obtuvieron resultados similares también por SEC y luego lo confirmaron por DLS para soluciones de β–lg al 1,86 % p/p calentadas a 60 °C. Además con el aumento del tiempo encontraron un crecimiento del tamaño de los agregados y un aumento en la amplitud de la distribución, resultados que coinciden con los presentados en la **Figura I.1.6**.

En la **Figura I.1.6** se observa además, que con el aumento de la temperatura de 25 °C a 75 °C, la posición del máximo del pico de menor tamaño se movió a tamaños más pequeños (zoom del primer pico en la **Figura I.1.6A**) (desde *d(H)* 5,5 – 6 nm a 4,2 nm) indicando la disociación del dímero nativo a monómeros, proceso mencionado anteriormente, que ocurre a la T_p de β–lg, de acuerdo con *Lefevre & Subirad (1999)* quienes observaron este comportamiento por espectroscopia FT–IR. Esto confirma que la agregación de esta proteína es a partir de los monómeros *(Apenten, Khokhar & Galani, 2002; Hoffmann & van Mil, 1999; Manderson, Hardman & Creamer, 1998; Mc Kenzie, 1971; Morgan, Leónil, Mollé & Bouhallab, 1999; Qi, Brownlow, Holt & Sellers, 1995; Qi, Holt, McNulty, Clarke, Brownlow & Jones, 1997)* aunque la disociación es completa sólo a muy bajas concentraciones *(Aymard et al., 1996)*.

Otra forma de analizar los resultados obtenidos a partir del análisis de Contin (análisis de las distribuciones) es evaluar la desaparición de picos de tamaño pequeño y la aparición de los de mayor tamaño (**Figura I.1.7**). Así, por ejemplo, en la distribución de tamaño por intensidad de la solución de β–lg 6 % (**Figura I.1.6A**) se pueden diferenciar claramente 2 picos principales: Pico 1: en el rango de 3 a 10 – 15 nm; Pico 2: en el rango de 10 – 15 a 100 nm.

En la **Figura I.1.7** se muestra el cambio en el % de área en la distribución por intensidad de dichos picos, con el aumento de la temperatura de calentamiento. De nuevo, se pone en evidencia el cambio que ocurre a los 65 °C (~ T_o), temperatura a la cual la proteína comienza su desnaturalización irreversible causando la exposición de su interior hidrofóbico, lo que promueve la agregación.

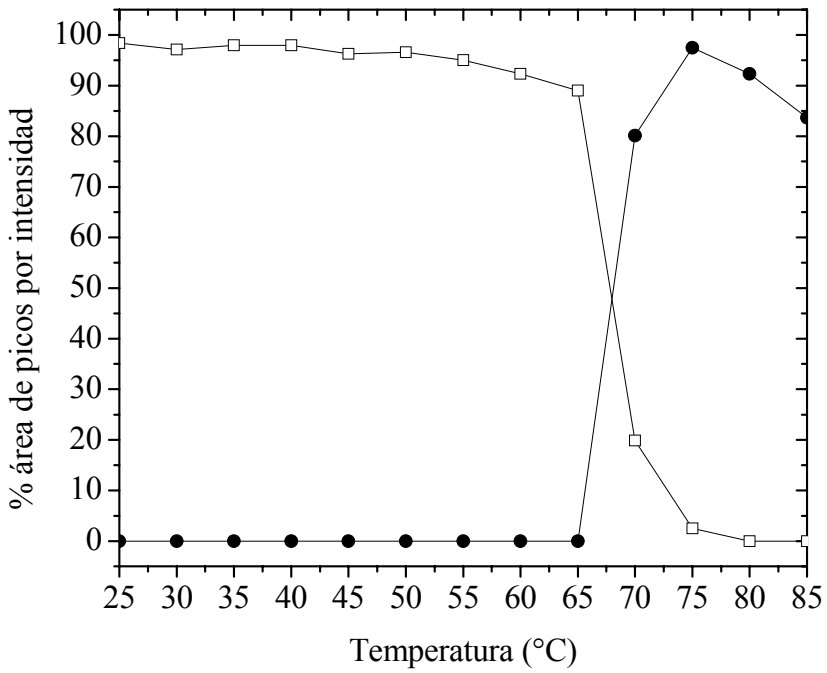


Figura I.1.7. Cambio en el % de área en la distribución de tamaño de partícula por intensidad de los picos presentes en la solución de β–lg 6 % p/p a pH 7 durante el calentamiento. (□) Pico 1: de 3 a 10 nm, (●) Pico 2: de 10 a 100 nm.

En la **Figura I.1.8** y **I.1.9** se muestran los resultados obtenidos a partir del análisis de Cumulantes.

En la **Figura I.1.8A** se observa el aumento del *d(H)* promedio con la temperatura a partir de 65 °C para todas las concentraciones de β–lg estudiadas. Dicha temperatura corresponde a la temperatura de inicio de desnaturalización (T_o) de la β–lg como se mostró en la **Figura I.1.5**.

Haque & Sharma (1997) también encontraron que los cambios más grandes en el tamaño de agregados de β–lg ocurrieron alrededor de los 70 °C. *Verheul, Roefs & de Kruif (1998)* informaron una mayor velocidad inicial de desnaturalización/agregación de β–lg a pH 7 con el aumento de la temperatura desde 65 °C a 70 °C. Se observó el mismo comportamiento para otras proteínas del suero *(Beaulieu, Corredig, Turgeon, Wicker & Doublier, 2005; Su, Qi, He, Zhang & Jin, 2008)*.

En la **Figura I.1.8B** se muestra el tamaño de agregado obtenido al final del calentamiento (85 °C), es decir el punto final de la **Figura I.1.8A** con el objetivo de comparar los tamaños obtenidos a las diferentes concentraciones de proteína.

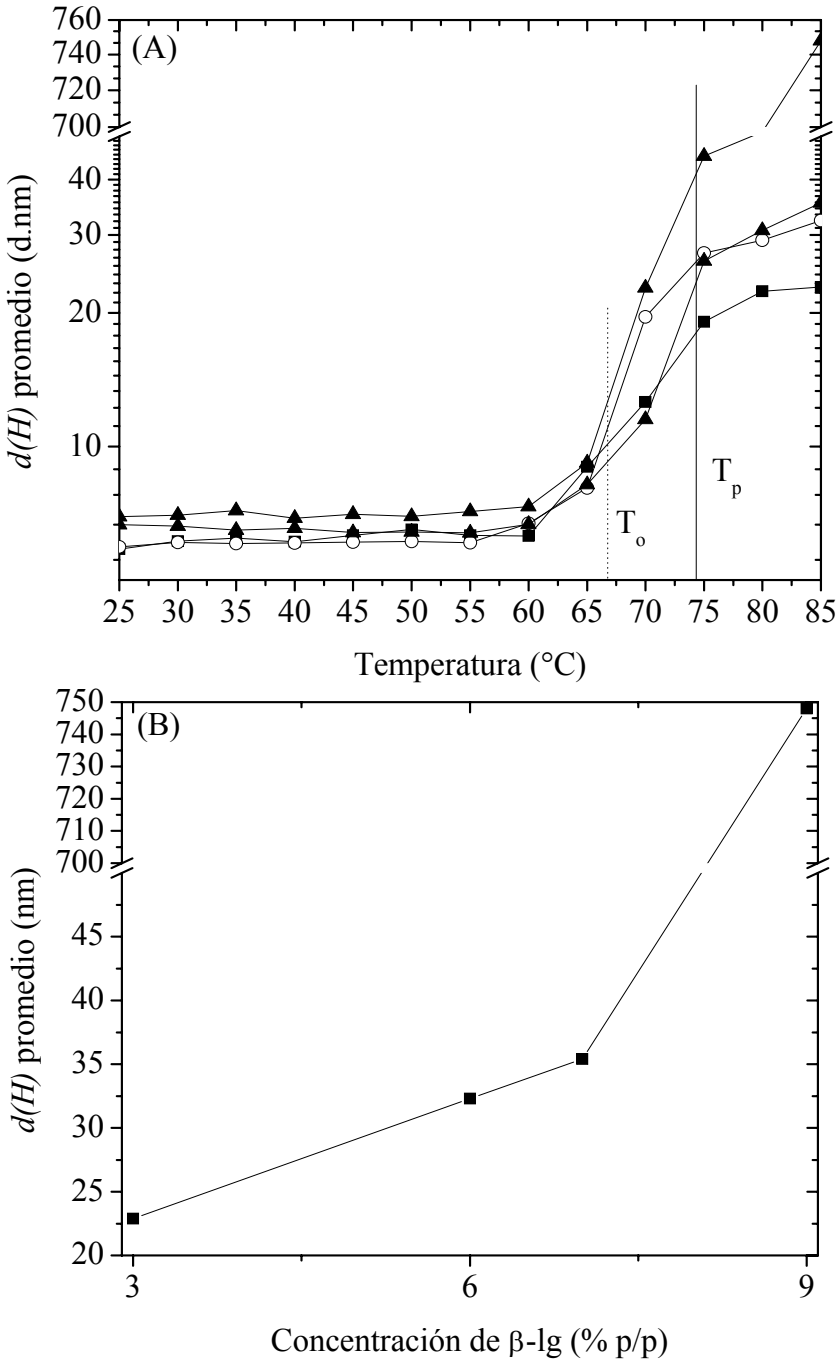


Figura I.1.8. (A) Cambio del *d(H)* promedio con la temperatura de calentamiento en soluciones de β–lg a pH 7. Concentración (% p/p): (□) 3, (●) 6, (△) 7, (▼) 9. Con línea punteada y línea sólida se indican las T_o y T_p de β–lg a pH 7, respectivamente, obtenidas por DSC (**Figura I.1.5**); (B) Cambio del *d(H)* promedio con la concentración de β–lg (% p/p) a pH 7. Temperatura 85 °C.

El tamaño de los agregados aumenta con el aumento de la concentración de acuerdo con *Baussay, Le Bon, Nicolai, Durand & Busne (2004)*. El *d(H)* promedio a 85 °C aumenta de 23

nm a 750 nm para un aumento en la concentración de proteína del 3 al 9 % p/p. Estos valores coinciden con otros reportados previamente *(Baeza, Gugliotta & Pilosof, 2003; Hoffmann et al., 1997; Roefs & de Kruif, 1994; Verheul et al., 1998)* donde se estudió, por técnicas de dispersión de luz, el tamaño de los agregados formados por tratamiento térmico de β–lg a diferentes concentraciones, y se encontró que a concentraciones entre 0,9 y 5 % p/p se obtuvieron agregados con *d(H)* promedio de 20 – 25 nm y dicho valor fue mayor (alrededor de 30 – 40 nm) para soluciones de β–lg entre 6 y 7,5 % p/p. También *Ju & Kilara (1998)* obtuvieron tamaños semejantes luego del tratamiento térmico de sistemas de WPI. En todos estos estudios previos se encontró que el *d(H)* promedio aumentó durante el calentamiento y que al alcanzar los valores mencionados anteriormente se mantuvieron constantes.

Todos estos estudios están de acuerdo con los resultados mostrados en la **Figura I.1.8** para las concentraciones entre 3 y 7 % p/p. El plateau alcanzado no es debido a la reacción de toda la proteína nativa, sino debido a la formación de partículas de un peso promedio constante (*Hoffmann et al., 1996*).

Para soluciones de β–lg a concentraciones de 9 % p/p y mayores *Hoffmann et al. (1997)* y *Roefs et al. (1994)* encontraron un comportamiento particular, en el cual el *d(H)* promedio no alcanza un plateau como lo hacen las concentraciones menores, sino que sigue creciendo su tamaño durante un tiempo prolongado alcanzando así valores mucho más grandes que los mencionados anteriormente. Esta particularidad fue atribuida al "efecto de Trommsdorff" que es causado por un aumento de la viscosidad del medio mientras se produce la reacción de agregación debido a la formación de agregados muy grandes. Así, se afecta el movimiento de difusión y rotación de los intermediarios de la reacción lo que acelera la reacción de agregación y aumenta el tamaño de los agregados con el tiempo. Esto podría explicar el comportamiento encontrado en nuestro sistema de β–lg al 9 % p/p.

El grado de asociación de la proteína es reflejado también por el índice de polidispersidad *(Haque, Casay, Wilson, Antila & Antila, 1993)* dando valores más altos cuando existe más de una familia de partículas (o picos) o cuando el pico es muy ancho. Así, en la **Figura I.1.9** se observa la tendencia, mostrada anteriormente por el análisis de las distribuciones, de aumento del grado de asociación en la etapa final del calentamiento (85 °C) con el incremento de la concentración proteica.

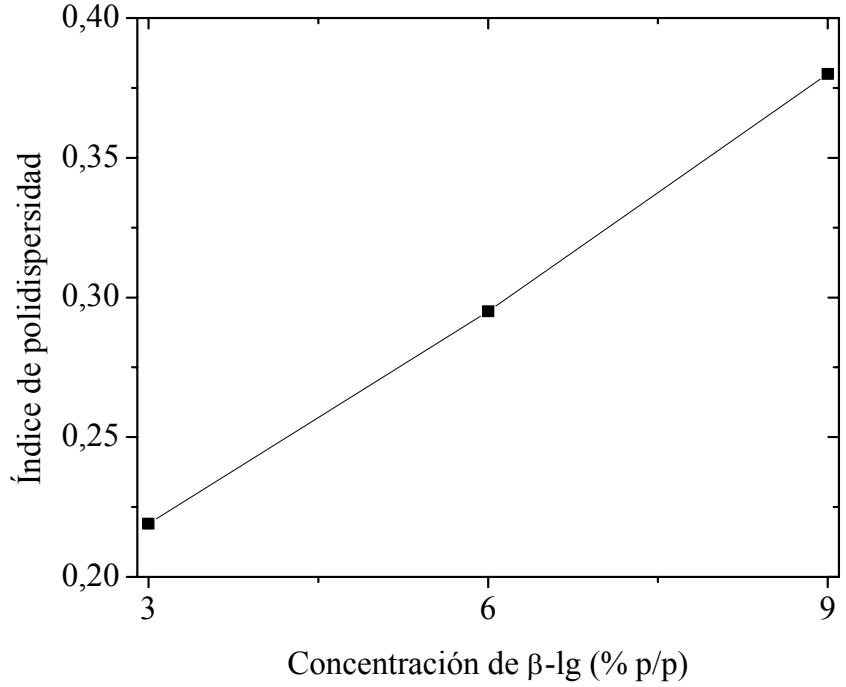


Figura I.1.9. Índice de polidispersidad vs concentración de β–lg (% p/p). Temperatura 85 °C, pH 7.

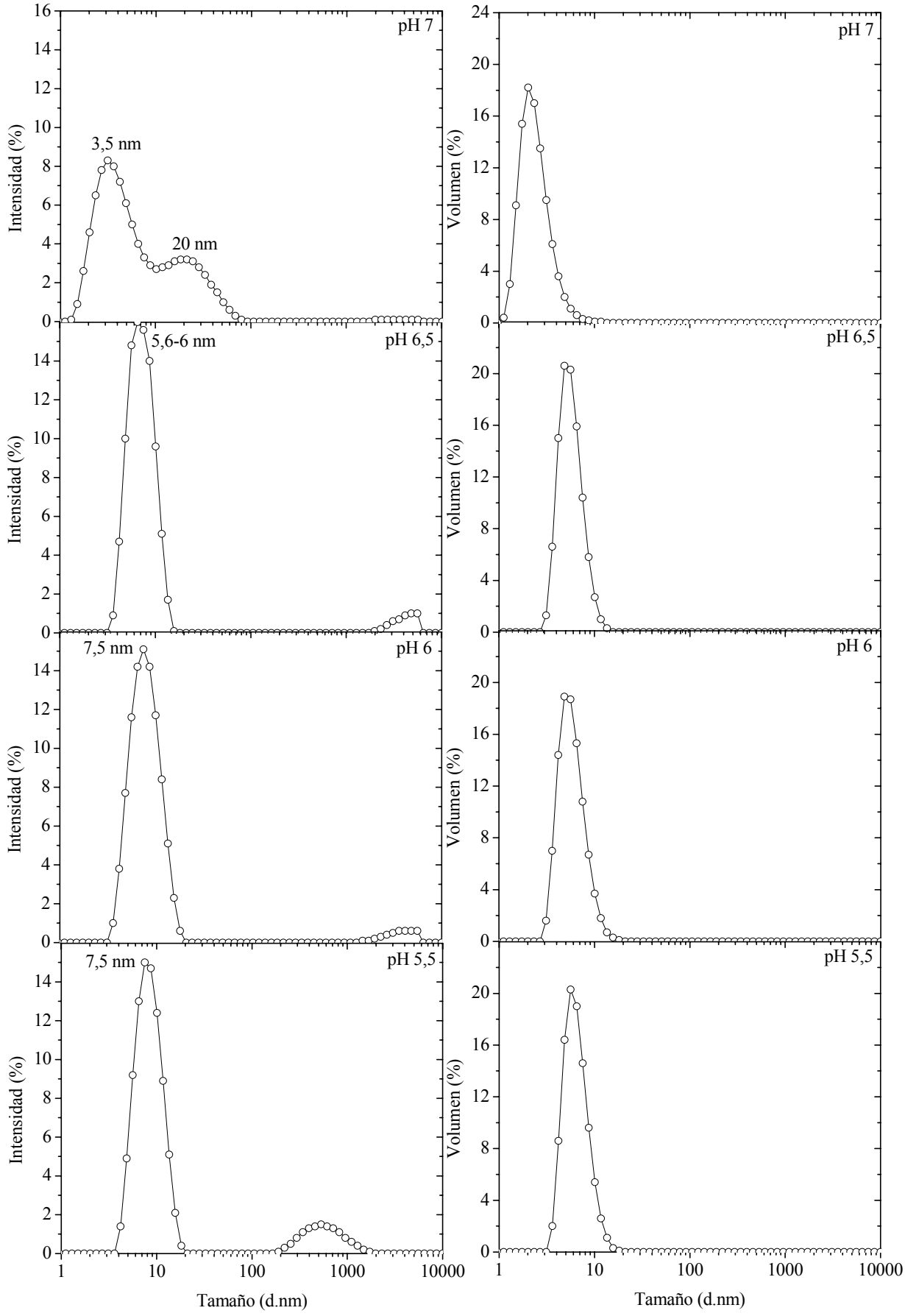
Como se ha visto, existen numerosos trabajos sobre el comportamiento de β–lg a pH 7. *Relkin (1998)* estudió la reversibilidad de los cambios conformacionales y de la exposición de grupos hidrofóbicos durante el calentamiento isotérmico de β–lg a pH 7 y diferentes temperaturas y postuló un modelo que sugiere lo siguiente: i) después de la disociación de dímeros a monómeros, los grupos tiol libres y algunos grupos hidrofóbicos se exponen a la superficie a temperaturas de 70 °C o mayores, ii) luego de un calentamiento rápido (10 °C/min) a temperaturas menores o iguales a 80 °C tienen lugar asociaciones hidrofóbicas intermoleculares, iii) al exponer a la proteína durante largos tiempos a temperaturas iguales a 80 °C se superponen reacciones intermoleculares de intercambio tiol–disulfuro y uniones hidrofóbicas. Conclusiones similares obtuvieron *Manderson et al. (1998)* luego de estudiar el efecto del tratamiento térmico sobre la conformación y agregación de β–lg a pH 6,7 y 7,4 por técnicas electroforéticas. En un review muy reciente, *de Wit (2009)* analiza en detalle los cambios conformacionales ocurridos en la β–lg a pH mayor a 6,8, sometida a diferentes tratamiento térmicos entre 60 °C y 150 °C en relación a la desnaturalización y la agregación y obtuvo resultados similares a los mencionados anteriormente.

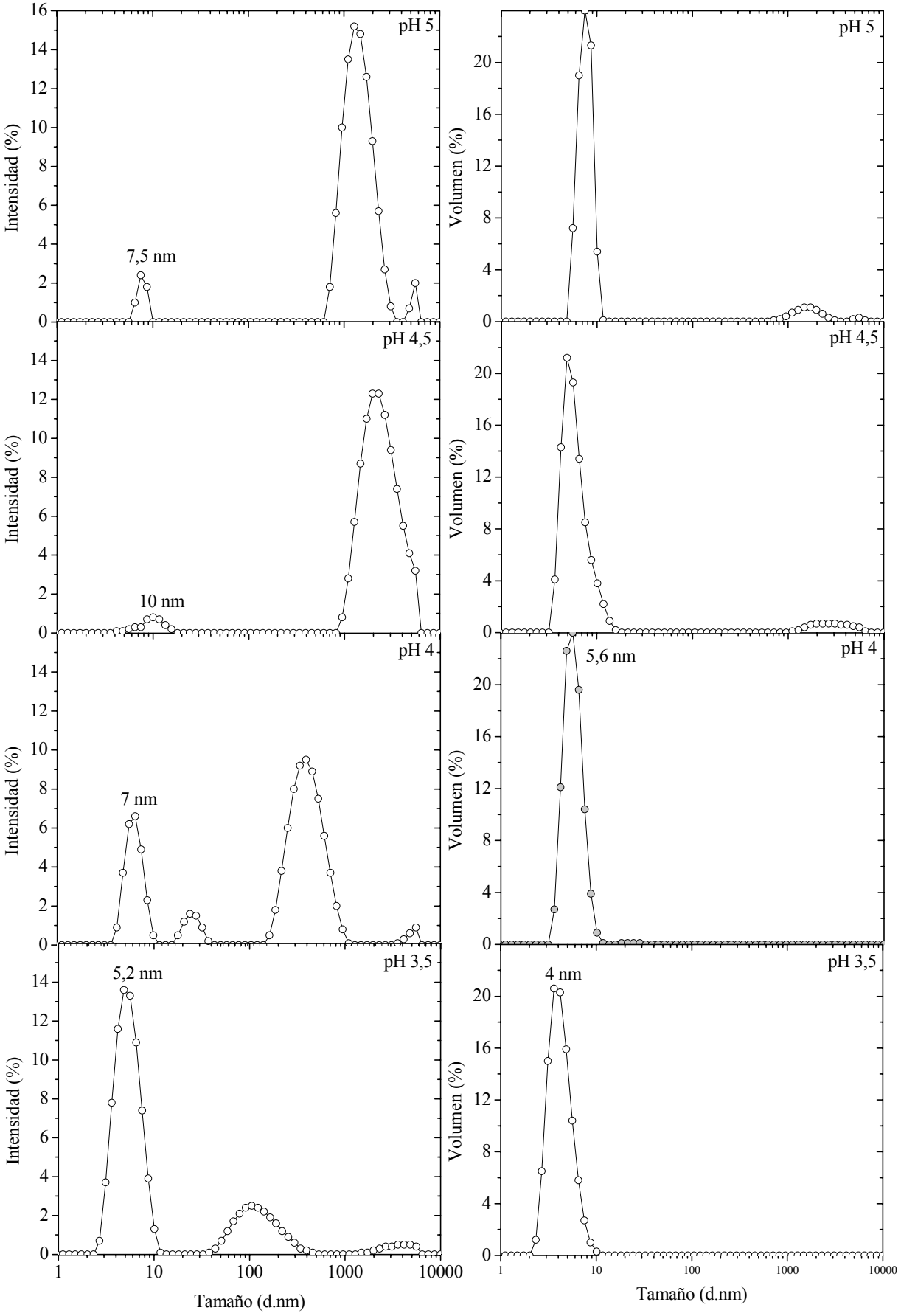
I.1.1.3. Efecto del pH sobre el estado de asociación de β–lg.

En este apartado se estudió el efecto del pH sobre el estado de asociación de β–lg (de Davisco) en solución a temperatura ambiente y sometida a tratamiento térmico. Para dicho estudio se seleccionó la menor concentración antes estudiada (3 % p/p) para poder evaluar el efecto del pH sobre el estado de asociación de la proteína minimizando el efecto de la concentración.

En la **Figura I.1.10** se muestra la distribución de tamaño de partícula por intensidad y volumen de β–lg a diferentes pH. Estas mediciones se realizaron inmediatamente después de ajustado el pH. A pH 7 se observa una distribución semejante a la observada en la **Figura I.1.1**, aunque en este caso además del pico en tamaños menores a 10 nm, aparece un pequeño pico en tamaños mayores. Esto podría deberse a la presencia de impurezas en esta muestra que es diferente a la utilizada en el apartado anterior. De todos modos, al analizar esta solución en la distribución por volumen, observamos que el pico de tamaños mayores no aparece con lo cual se puede considerar despreciable y así el análisis sería prácticamente el mismo que el observado en la **Figura I.1.1**. El pico principal está formado por especies que corresponden principalmente al monómero de β–lg, aunque también incluye dímeros. Es importante recordar que este comportamiento ocurría a concentraciones bajas de β–lg, pero a concentraciones mayores a 5 % p/p, esta proteína a pH neutro se encuentra mayoritariamente como dímero.

A pH 6,5 se observa un único pico tanto en la distribución por intensidad como en la distribución por volumen con un valor máximo de alrededor de 6 nm, que corresponde a la forma dimérica de la proteína. Al disminuir el pH, el pico correspondiente a los tamaños menores se corre levemente hacia valores más grandes, hasta llegar al rango de pH isoeléctrico (4,5 – 5) donde se observa una notable disminución del pico de menor tamaño y la aparición de un importante pico en tamaños de más de 1000 nm que comienza a verse en las distribuciones de volumen.


pH 7
3,5 nm
20 nm
pH 6,5
5,6-6 nm
pH 6
7,5 nm
pH 5,5
7,5 nm
Intensidad (%)
Volumen (%)
Tamaño (d.nm)
1
10
100
1000
10000


pH 5
7,5 nm
pH 4,5
10 nm
pH 4
7 nm
pH 3,5
5,2 nm
Intensidad (%)
Volumen (%)
5,6 nm
4 nm
Tamaño (d.nm)

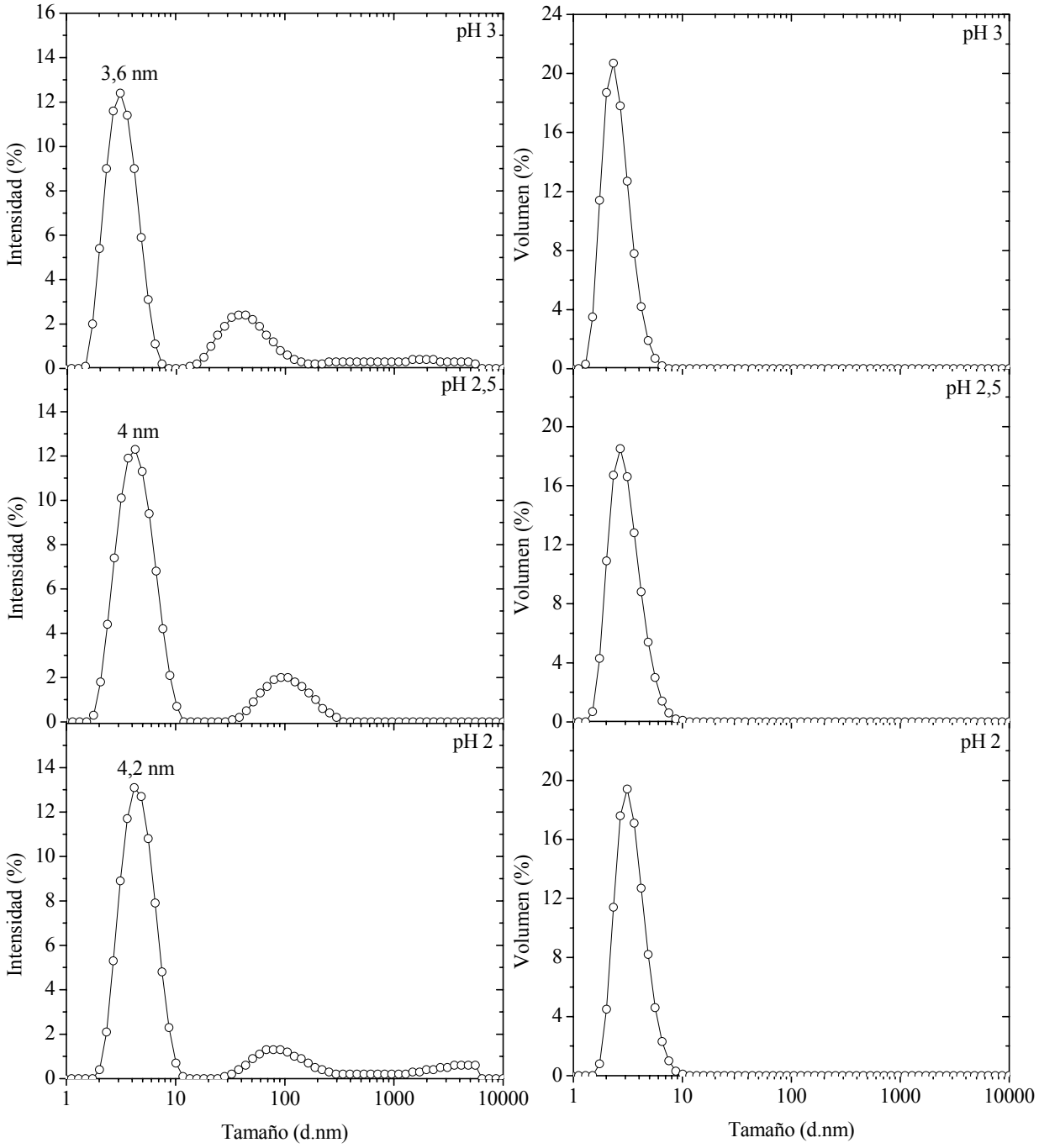


Figura I.1.10. Distribución de tamaño de partícula por intensidad y volumen de soluciones de β–lg al 3 % p/p a diferentes pH. Temperatura 25 °C.

Como se mencionó en la **Introducción**, el punto isoeléctrico (pI) de la β–lg se encuentra entre 4,6 y 5,2 *(Bromley, Krebs & Donald, 2005; Das & Kinsella, 1989; Harnsilawat et al., 2006)*. Al pasar el rango isoeléctrico y disminuir el pH aún más (desde 4 hasta 2), vuelve a aparecer como pico principal el que se encuentra en los tamaños más bajos, y además se observa un

corrimiento leve hacia valores menores a medida que disminuye el pH, correspondientes al monómero de β–lg.

En las distribuciones por intensidad de β–lg a pH por debajo del pI se observa también un pequeño pico en el rango de tamaño de 50 – 100 nm de diámetro y para la solución a pH 4 aparece además un pico en tamaños mayores a 100 nm. Sin embargo, al analizar las distribuciones por volumen (todos los gráficos de la columna derecha) se puede ver claramente que sólo las soluciones a pH 4,5 y 5, pH más cercanos al pI de la proteína, son las que muestran un pico correspondiente a formas asociadas además del pico de menor tamaño, demostrando que la cantidad de partículas de grandes tamaños observadas en las soluciones a pH alejados del pI son despreciables.

La fuerza que conduce a la asociación de la proteína cerca de su punto isoeléctrico es probablemente una combinación de interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals y atracciones electrostáticas localizadas entre grupos positivos de una proteína y grupos negativos de otra *(Harnsilawat et al., 2006)*.

La **Figura I.1.11** muestra una ampliación del pico de menor tamaño para algunos valores de pH, uno por encima del pI (pH 6,5), otro por debajo del pI (pH 2,5) y dos cercanos al rango del pI a fin de analizar el corrimiento de los picos con el pH.

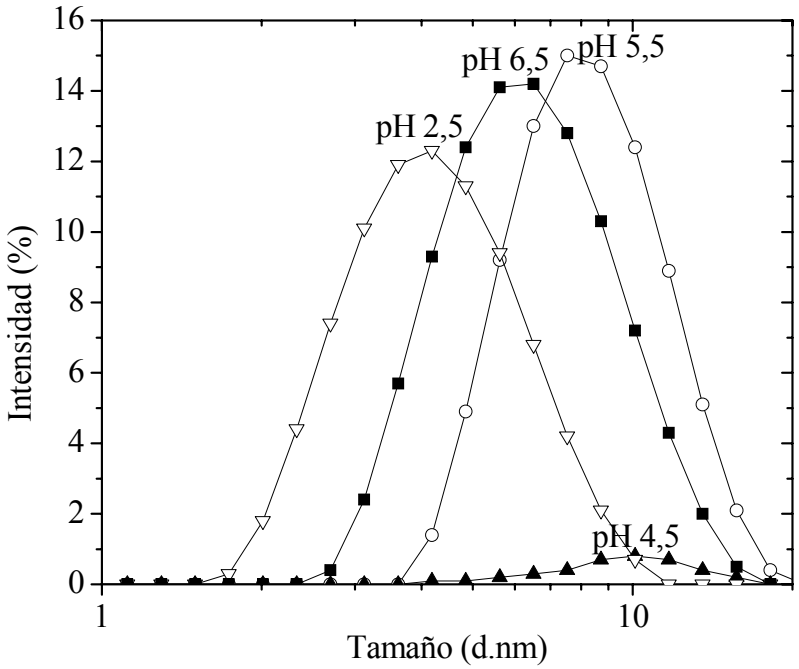


Figura I.1.11. Distribución de tamaño de partícula por intensidad del pico de menor tamaño de soluciones de β–lg al 3 % p/p a pH: (■) 6,5, (○) 5,5, (▲) 4,5, (▽) 2,5.

A pH 2,5 se observan los valores máximos de pico más chicos; a pH 6,5 se observan máximos de pico que corresponden a la forma dímerica de β–lg, mientras que cerca del pI se observan tamaños más grandes.

A partir del *d(H)* correspondiente a los máximos de este pico de menor tamaño en la distribución por intensidad se puede estimar el peso molecular de la proteína mediante una herramienta del software del equipo de medición de dispersión de luz láser Malvern Nano ZS. La **Tabla I.1.1** muestra el peso molecular (PM) correspondiente al *d(H)* del pico de menor tamaño y el estado de asociación predominante de la β–lg a cada pH.
El comportamiento observado a diferentes pH sugiere que el balance entre la asociación y la disociación de la β–lg es dependiente del pH lo que está de acuerdo con numerosos estudios previos *(Gottschalk, Nilsson, Roos & Halle, 2003; Mehalebi et al., 2008; Pessen, Purcell & Farrell, 1985; Relkin, 1996; Relkin, 1998; Sakurai & Goto, 2007; Verheul et al., 1999)*. *Mehalebi et al. (2008)* midieron el *d(H)* de soluciones de β–lg a diferentes pH entre 5,2 y 8 y en un amplio rango de concentraciones también mediante técnicas de dispersión de luz y encontraron mayores diferencias en el *d(H)* con el pH a altas concentraciones de proteína. A una concentración del 3 % p/p de β–lg, ellos encontraron los mismos resultados que se presentan en la **Figura I.1.10**.

Tabla I.1.1. Estado de asociación predominante (EAP) de β–lg a diferentes pH estimado a partir del valor del pico de menor tamaño de las distribuciones de tamaño de partícula por intensidad de la **Figura I.1.10**.

pH	*d(H) máx* (nm)	PM* (kDa)	EAP** de β–lg
7	3,5	12,5	monómero
6,5	5,6 – 6	37,4 – 44	dímero
6	7,4	71,9	tetrámero
5,5	7,5	74,2	
5	7,6	76,5	
4,5	10,1	148,8	octámero
4	7	64	tetrámero
3,5	5,3	32,9	dímero
3	3,6	13,3	monómero
2,5	4	17	
2	4,2	19,1	

* Estimado mediante el software del Nano Zetasizer, Malvern.

** Calculado como PM estimado/PM del monómero de β–lg.

La β–lg a pH 4,6 se encuentra en forma de octámero *(Gottschalk et al., 2003; Mills & Creamer, 1975; Pessen et al., 1985; Verheul et al., 1999)*. *Townend & Timasheff (1960)* encontraron que a pH entre 3,7 y 5,2 se produce una asociación específica a un octámero de 144 kDa de peso molecular. Este proceso de asociación tiene un máximo a pH entre pH 4,4 y 4,65, justo por debajo del pI *(Gottschalk et al., 2003)*. *Sakurai & Goto (2007)* estudiaron, mediante un análisis de componentes principales (PCA), la estructura tridimensional de β–lg obtenida por simulación y reportaron cambios en la estructura de la proteína a pH 5, pero sus análisis de fluorescencia no evidenciaron un cambio conformacional importante a este pH. Las diferencias en la estructura, encontradas en el análisis de PCA, las atribuyeron a cambios causados por la formación de octámeros al acercarse al pI que no involucran modificaciones apreciables en la estructura secundaria.

Mills & Creamer (1975) y *Renard, Lefebvre, Griffin & Griffin (1998)* encontraron diferencias en la intensidad de fluorescencia en soluciones de β–lg a pH entre 2 y 7 y atribuyeron este comportamiento al equilibrio monómero–dímero que a pH 7 favorece la formación de dímeros, y cuando el pH disminuye a 2 favorece la disociación a monómeros. *Uhrínová, Smith, Jameson, Uhrín, Sawyer & Barlow (2000)* encontraron por espectroscopía de RMN que a pH 2,6 la β–lg se encuentra en forma monomérica más que en forma dimérica. A pH ácido (2 – 3,5), lejos del pI, la β–lg muestra más tendencia a la disociación debido al efecto de repulsión electrostática (*Verheul et al., 1999*). Este comportamiento también fue observado para pH básico (pH > 7,5 – 8) (*Mehalebi et al., 2008; Relkin, 1998; Verheul et al., 1999*).

A partir de los resultados obtenidos hasta aquí, se decidió investigar si la asociación de β–lg inducida por pH prosigue con el tiempo a temperatura ambiente (25 °C).

Las soluciones de β–lg a pH más cercanos al pH isoeléctrico (pH 4,5 y pH 5) no pudieron estudiarse de esta manera porque, como se mostró en la **Figura I.1.10**, inmediatamente después de ajustado el pH, ya se observaron estructuras asociadas de gran tamaño y poco después los resultados daban con numerosos errores debido a la presencia de partículas con tamaños fuera del rango de medición del equipo. *Donovan & Mulvihill (1987)* encontraron que en el rango de pH entre 4,5 y 5,5 ocurría la mayor asociación de β–lg.

Por otro lado, las soluciones de β–lg a pH alejados del pI no mostraron asociación en el tiempo, mientras que en las soluciones a pH 4 y 5,5 se observó un cambio en el diámetro

hidrodinámico promedio en el tiempo, hasta alcanzar un valor casi constante, que fue en 150 minutos y 15 días, respectivamente (**Figura I.1.12**).

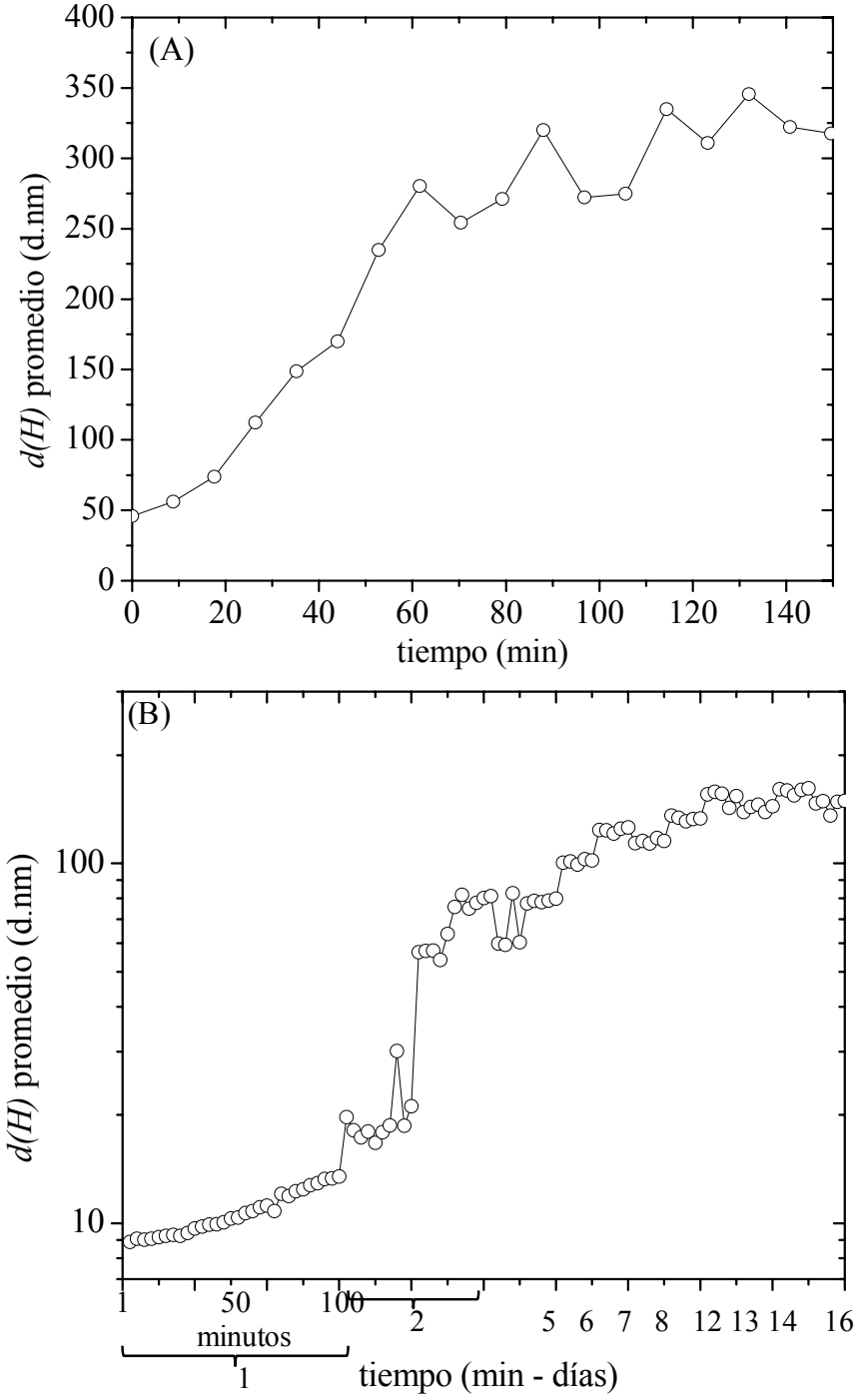


Figura I.1.12. Cambio del *d(H)* promedio en el tiempo a pH: (A) 4 y (B) 5,5. Temperatura 25 °C.

El *d(H)* promedio alcanzado para la solución de β–lg a pH 4 fue de más de 300 nm, valor superior que el alcanzado para la solución a pH 5,5.

En la **Figura I.1.13** se observa la distribución por intensidad y volumen de las soluciones de β–lg a pH 4 y 5,5, inmediatamente después de ajustado el pH y luego de un tiempo.

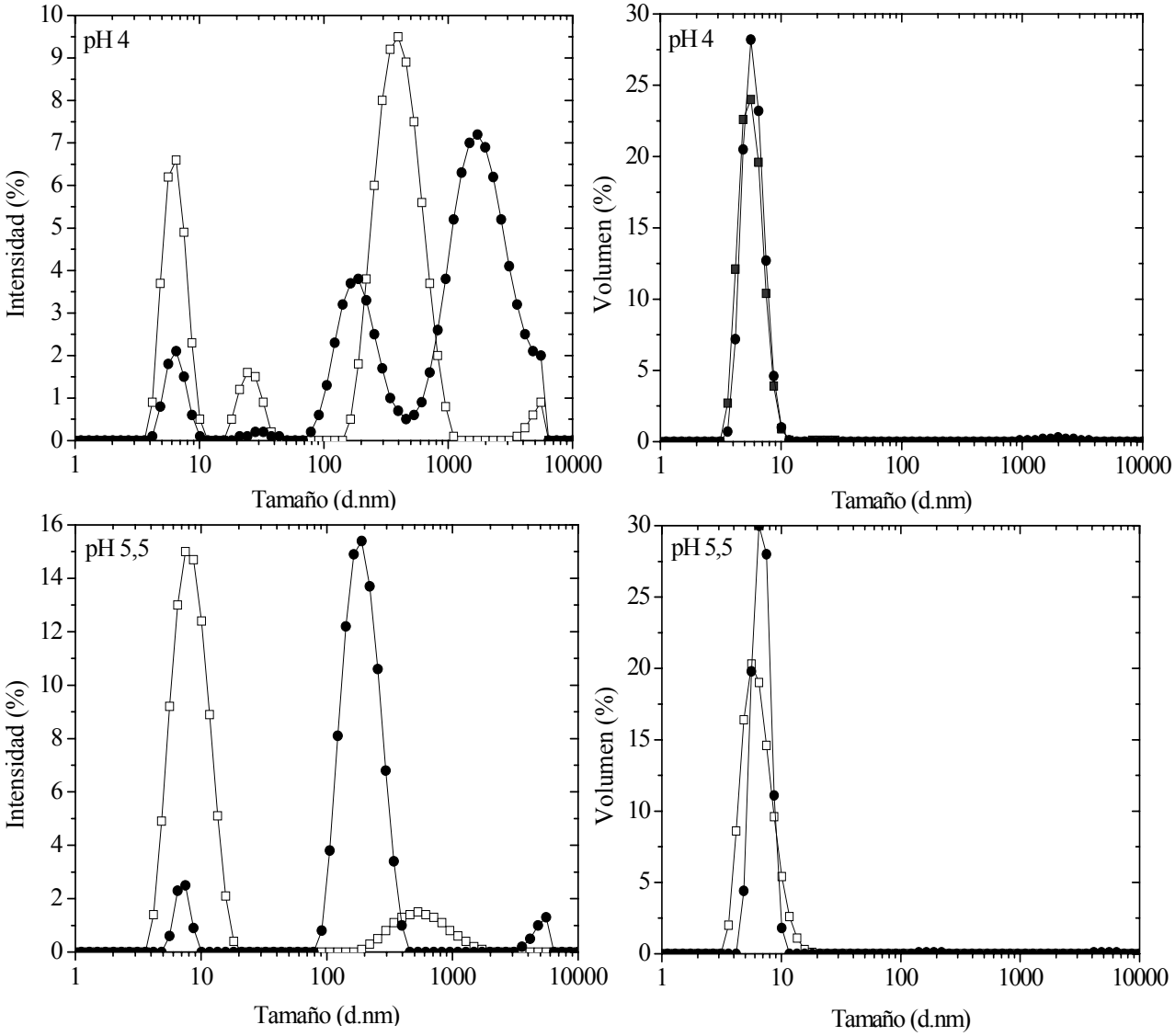


Figura I.1.13. Distribución de tamaño de partícula por intensidad (columna izquierda) y volumen (columna derecha) de una solución de β–lg al 3 % p/p a pH 4 y 5,5, (□) inmediatamente después de ajustado el pH y (●) a determinado tiempo (150 minutos para la solución a pH 4 y 15 días para la solución a pH 5,5). Temperatura 25 °C.

Se puede observar, en ambas soluciones, la disminución de la intensidad del pico correspondiente a la forma tetramérica y la aparición de formas más asociadas que son las que producen un aumento en el *d(H)* promedio analizado en la **Figura I.1.12**. Sin embargo, las estructuras asociadas no son muchas ya que prácticamente no son visibles en las

distribuciones por volumen, lo que podría deberse a que la concentración de proteína en estos sistemas no es suficiente para formar gran cantidad de estructuras asociadas.

Las soluciones de β–lg a pH más alejados del pI de la proteína (que no mostraron asociación a temperatura ambiente) fueron sometidas a tratamiento térmico en el rango 25 – 85 °C.
Verheul et al. (1998) estudiaron la velocidad de agregación de β–lg a varias temperaturas de calentamiento, a una concentración de 0,9 % p/p, y encontraron en el tratamiento térmico a temperaturas mayores a 75 °C el siguiente orden de velocidad de reacción: pH 5 > pH 6 > pH 7 > pH 2 > pH 2,5 > pH 3 > pH 4 > pH 3,5, mientras que a 65 °C no encontraron tantas diferencias, lo que fue atribuido al hecho de que dicha temperatura de calentamiento no superaba la temperatura de pico de desnaturalización de la proteína que aumentó desde 75 hasta más de 85 °C con la disminución del pH de 7 a 3 y luego disminuyó a 80 °C al bajar el pH hasta 2. Estos resultados de temperaturas de desnaturalización coinciden con los encontrados por *Relkin (1996)*.

La **Figura I.1.14A** muestra que por encima del pI se obtienen mayores velocidades de agregación y mayores valores de diámetro promedio a medida que el pH disminuye acercándose al pI de la proteína. Así, a pH 6, luego del calentamiento se obtienen agregados mucho mayores que a pH 6,5 y 7.
Hoffmann et al. (1996) estudiaron el tamaño de los agregados de β–lg luego de un tratamiento térmico en un rango de pH entre 6,2 y 8 y encontraron resultados similares, aumentando el *d(H)* promedio de los agregados al disminuir el pH, especialmente en el rango 6,2 – 6,9. En otro estudio, *Hoffmann et al. (1997)* encontraron, mediante estudios por SEC–MALLS, que los agregados obtenidos luego de calentar soluciones de β–lg al 1 % p/p durante 24 h a 65 °C, tenían un peso molecular promedio mucho más grande a pH 6,5 que a pH neutro. Estos resultados coinciden también con otros obtenidos previamente por *Baeza, Gugliotta & Pilosof (2001)* quienes estudiaron el efecto del pH sobre el *d(H)* de soluciones de β–lg a pH 6 y 7 luego de someterlas a un tratamiento térmico a 68 °C durante 50 minutos, obteniendo al final del calentamiento un *d(H)* promedio de 138 nm y 40 nm para pH 6 y 7, respectivamente. En un trabajo posterior, *Baeza et al. (2002)* estudiaron el efecto del pH (entre 6 y 7) sobre la temperatura de desnaturalización determinada por DSC y observaron un aumento de la estabilidad de la β–lg a medida que el pH se acerca al pI. Resultados similares en la

estabilidad térmica fueron obtenidos por *Relkin (1996)* y *Donovan & Mulvihill (1987)* en un amplio rango de pH. A pH cercano al pI, la β–lg tiene una conformación más compacta que es más resistente a la acción desnaturalizante del calor. Al aumentar el pH, aumenta la carga negativa de esta proteína resultando en repulsiones intra–moleculares más importantes, las cuales pueden facilitar el despliegue y la desnaturalización de la molécula de β–lg *(Mc Swiney, Singh & Campanella, 1994)*.

A pH cercanos al pI, donde las cargas se minimizan, se favorecen las interacciones proteína–proteína y se forman agregados más grandes, involucrando principalmente agregación física de las moléculas de proteína parcialmente desplegada. *Mehalebi et al. (2008)* encontró, luego de un tratamiento por calor extensivo (80 °C durante 15 h), que la β–lg a pH 5,8 formó grandes agregados aún a concentraciones muy bajas y que a pH entre 4 y 5,8 los agregados precipitaron.

Por otro lado, a pH por debajo del pI (**Figura I.1.14B**) las soluciones de β–lg a valores de pH más cercanos al pI presentaron *d(H)* promedio más pequeños al final del calentamiento que las soluciones a pH más ácidos (2 – 2,5). Además comparando las **Figuras I.1.14A** y **B** se puede observar que el valor más cercano al pI de la **Figura I.1.14B** (pH 3,5) presentó al final del calentamiento valores aún más pequeños de *d(H)* promedio que los obtenidos en las soluciones a pH 7, que fue el *d(H)* más pequeños observado en la **Figura I.1.14A**. Esto coincide con lo observado por *Haque et al. (1997)* quienes estudiaron el efecto del pH sobre la agregación térmica de β–lg por DLS y encontraron que luego del calentamiento de 25 a 90 °C, los agregados formados a pH 7 presentaron *d(H)* mayores que a pH 3,5. Además, estos autores, también estudiaron soluciones a pH 9 y obtuvieron al final del calentamiento un *d(H)* promedio mucho menor que a pH ácido y neutro, lo que puede explicarse por lo mencionado anteriormente, que a pH tan lejos del pI aumenta mucho más la carga negativa y por lo tanto las repulsiones electrostáticas reduciendo la tendencia a la agregación.

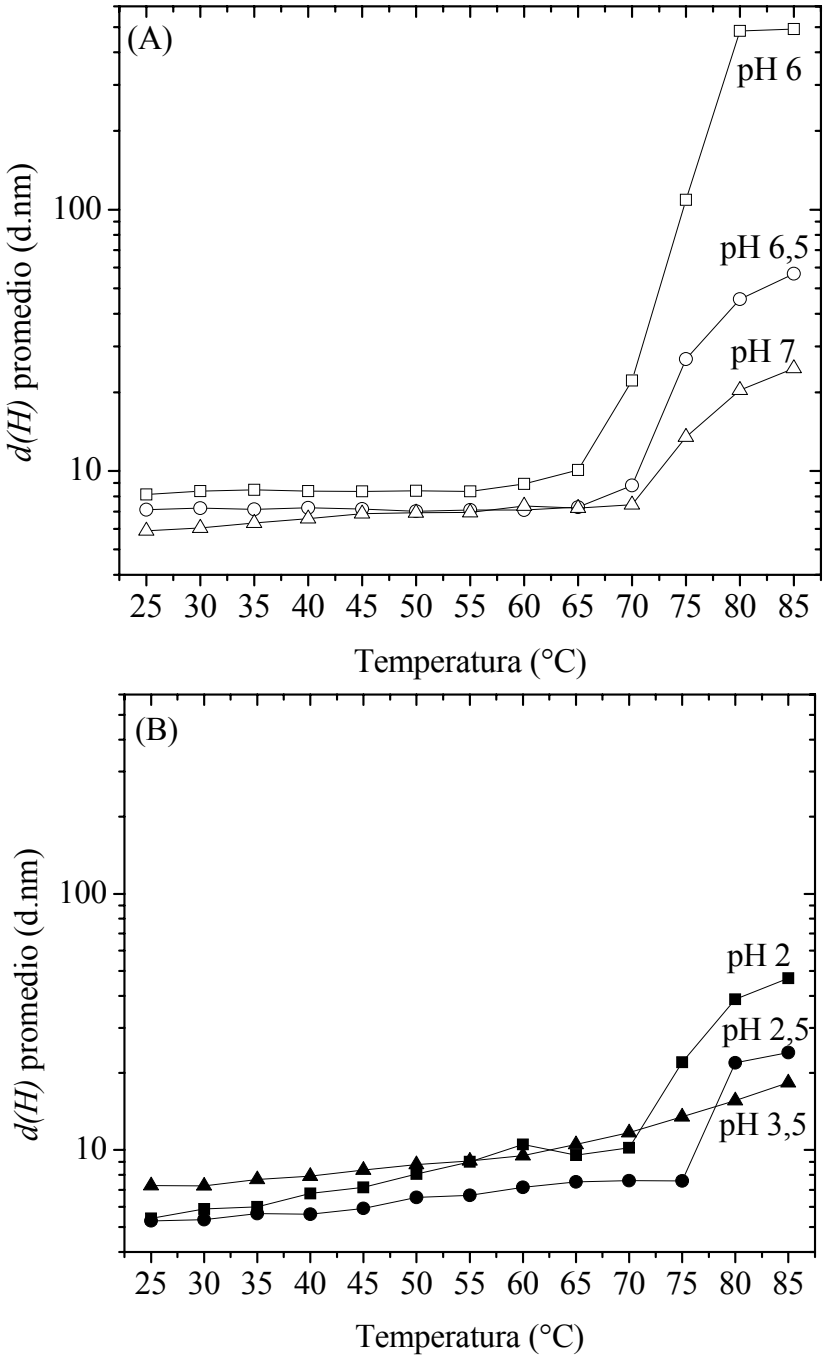


Figura I.1.14. Cambio del *d(H)* promedio durante el calentamiento de soluciones de β–lg a pH: (A) por encima del valor del pI: (□) 6, (○) 6,5 y (△) 7; y (B) por debajo del valor del pI: (■) 2, (●) 2,5 y (▲) 3,5.

La **Figura I.1.15** muestra las distribuciones, a temperatura ambiente, de las soluciones de β–lg a pH por encima del pI, antes y después del tratamiento térmico con el fin de comparar los tamaños de partículas obtenidos en cada caso, ya que el análisis del *d(H)* promedio no nos da

información sobre el número de poblaciones ni sobre *d(H)* de las mismas, sino un valor promedio de las poblaciones presentes.

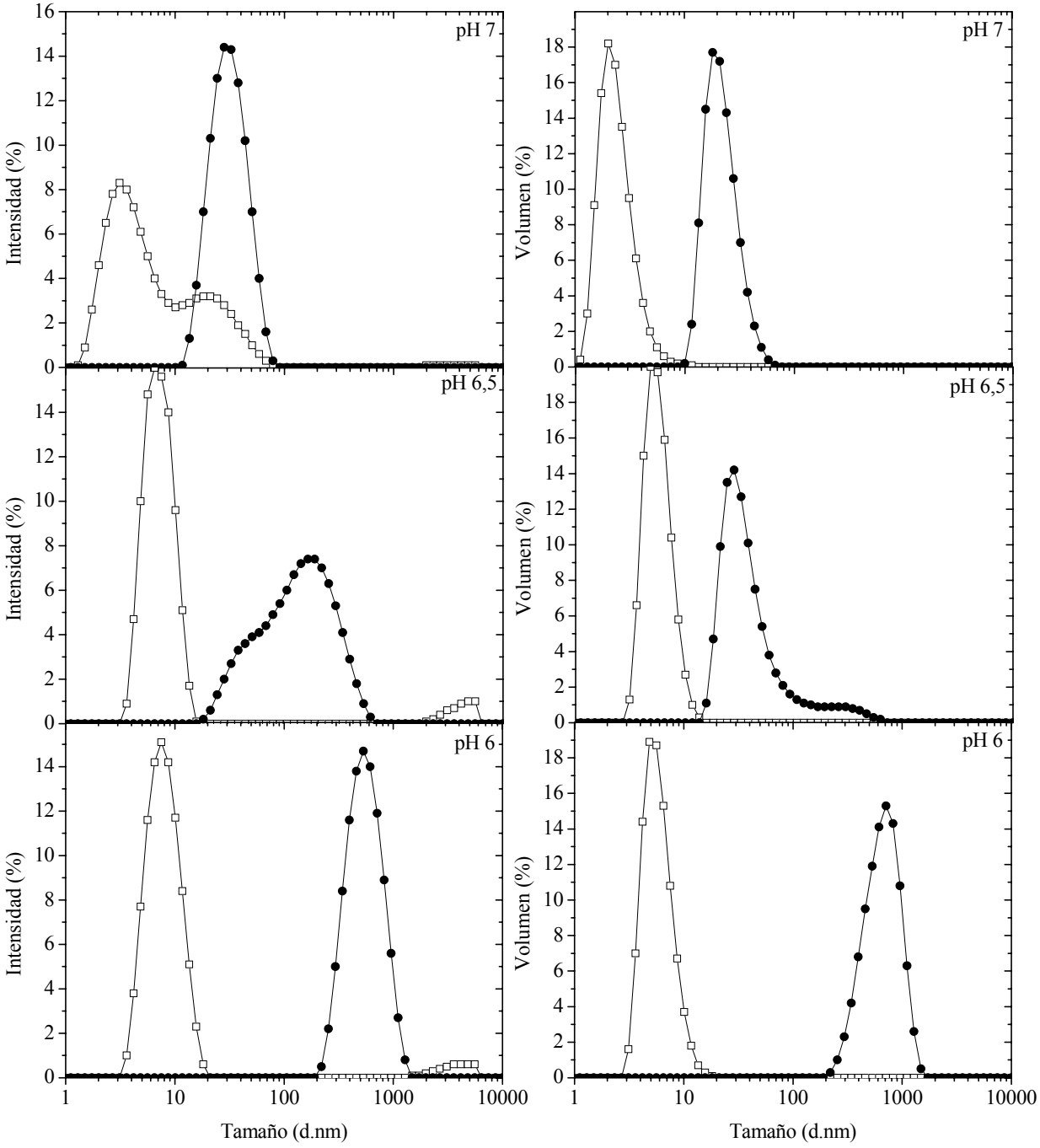


Figura I.1.15. Distribución de tamaño de partícula por intensidad (columna izquierda) y volumen (columna derecha) de una solución de β–lg al 3 % p/p a pH 7, 6,5 y 6, (□) antes y (●) después del tratamiento térmico hasta 85 °C. Temperatura 25 °C.

Se puede observar en las tres soluciones (pH 7, 6,5 y 6) la desaparición del pico monomérico o dimérico (según corresponda) y la aparición de formas más agregadas muy importantes en cantidad ya que se mantienen en las distribuciones por volumen en los tres casos. Además, se forman agregados de tamaños más grandes a medida que el pH disminuye acercándose al pI, lo que explica el mayor valor de *d(H)* promedio observado en la **Figura I.1.14A** para el sistema a pH 6.

En la **Figura I.1.16** se muestran las distribuciones, a 25 °C, de las soluciones a pH por debajo del pI de β–lg (pH 3,5, 2,5 y 2), también antes y después del tratamiento térmico.
Se observa un comportamiento diferente al de las soluciones de β–lg a pH por encima del pI, ya que a pesar de que se observa formación de agregados en las distribuciones por intensidad de las tres soluciones, estos no fueron importantes en cantidad como se puede observar en las tres distribuciones por volumen. Esto se podría atribuir al hecho de que a pH ácidos la temperatura de desnaturalización de la β–lg es mucho mayor que a pH por encima del pI *(Verheul et al., 1998)*, alcanzando valores superiores a 85 °C para pH 3 – 4 y cercano a 80 °C a pH 2, y por lo tanto el tratamiento térmico aplicado a estos sistemas no fue suficiente como para producir un número grande de agregados.

Aún así, en las distribuciones de tamaño de partícula por intensidad de la **Figura I.1.16** es posible observar que a medida que disminuye el pH, los pocos agregados formados son más grandes lo que se puede relacionar con la menor estabilidad térmica de la β–lg al bajar el pH por debajo de 3,5. Estos resultados están de acuerdo con los de *Verheul et al. (1998)* mencionados anteriormente quienes encontraron que la velocidad de la reacción de agregación disminuye en el orden: pH 2 > pH 2,5 > pH 3 > pH 3,5. *Relkin (1996)* encontró un elevado porcentaje de reversibilidad en los cambios conformacionales ocurridos en la β–lg a pH 3,5 tratada térmicamente, lo cual coincide con los resultados mostrados en la **Figura I.1.16** y lo atribuyó a que a pH ácido, las proteínas globulares permanecen compactas y el grupo carboxilo protonado que presentan, no participa en interacciones electrostáticas intermoleculares.

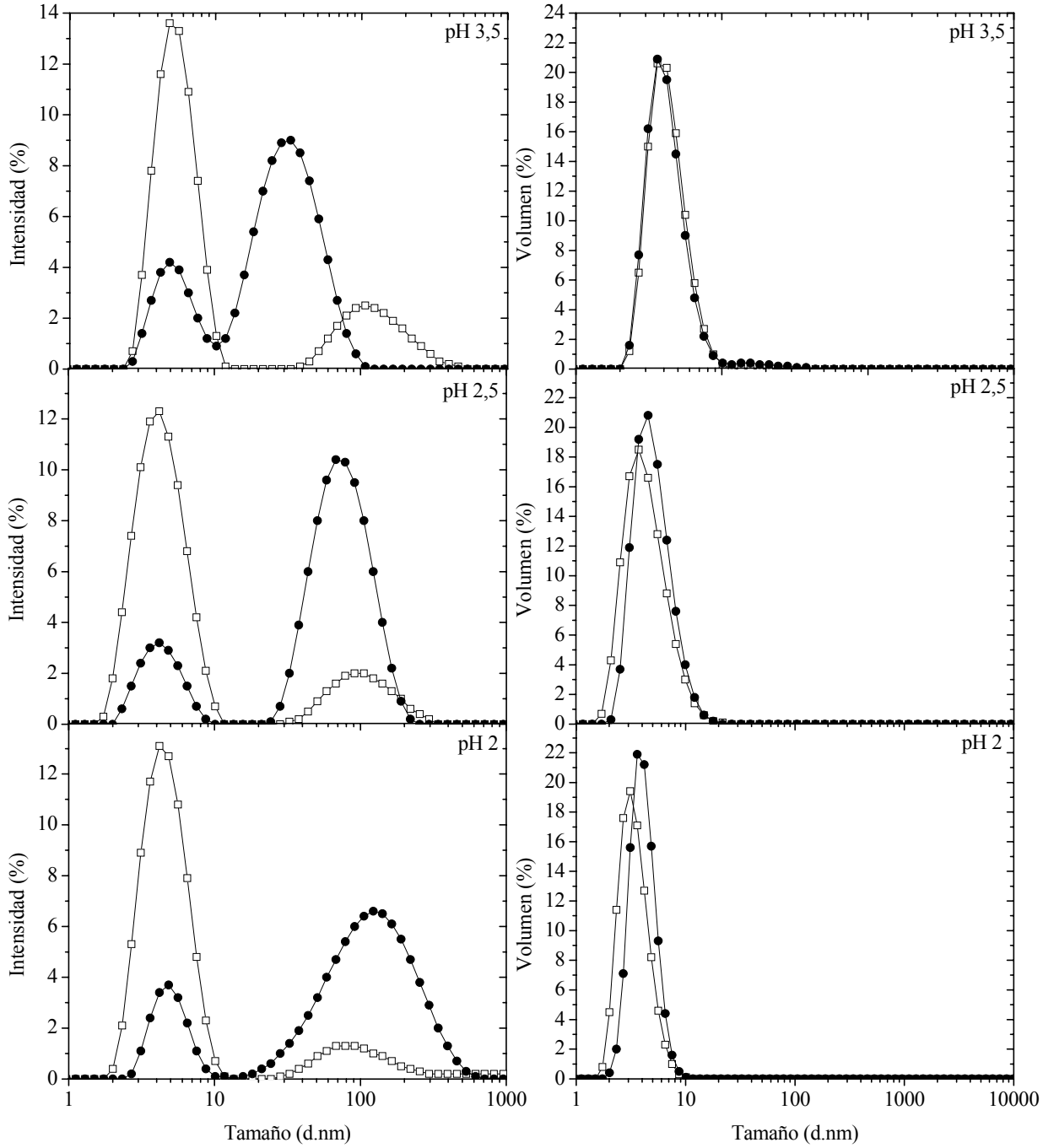


Figura I.1.16. Distribución de tamaño de partícula por intensidad (columna izquierda) y volumen (columna derecha) de una solución de β–lg al 3 % p/p a pH 3,5, 2,5 y 2, (□) antes y (●) después del tratamiento térmico hasta 85 °C. Temperatura 25 °C.

I.1.2. Asociación/autoensamblaje del CMP dependiente del pH.

I.1.2.1. Perfil electroforético del CMP.

En primer lugar se realizó una electroforesis del CMP y de otras proteínas del suero con fines comparativos, a fin de caracterizar el producto comercial utilizado.

La **Figura I.1.17** muestra el gel en condiciones desnaturalizantes (SDS–PAGE) y con β–mercaptoetanol como agente reductor, del CMP y de diferentes proteínas del suero (WPI, β–lg, α–la).

La calle correspondiente al WPI (B) muestra numerosas bandas, pero hay dos bandas que tienen mayor intensidad que corresponden a las principales proteínas del suero: β–lg (18,3 kDa) y α–la (14,2 kDa).

Las calles C y D corresponden a β–lg y α–la respectivamente, cada una con una banda mayoritaria correspondiente a su forma monomérica. Además en la calle de α–la (D), se observa otra banda de gran intensidad correspondiente a β–lg.

Al analizar la banda correspondiente al CMP (calle E) se observó la presencia de una banda mayoritaria y una minoritaria teñidas con Coomassie Blue (CB). La banda mayoritaria (CMP_A) es muy irregular y tiene una movilidad mayor que la anhidrasa carbónica (31 kDa) con un peso molecular entre 23 y 28 kDa, que corresponde a formas agregadas de CMP *(Nakano, Ikawa & Ozimek, 2007; Silva-Hernández, Nakano & Ozimek, 2002; Silva-Hernández, Nakano, Verdalet-Guzmán & Ozimek, 2004)*, mientras que la banda minoritaria (CMP_M) se presenta entre la aprotinina (6,5 kDa) y la lisozima (14,4 kDa), correspondiendo a la forma monomérica del CMP. Esta banda minoritaria se observa levemente teñida. Además en la calle correspondiente al CMP también se observó una pequeña banda en el tamaño correspondiente a la β–lg indicando la presencia de esta proteína del suero como contaminante en la muestra de CMP.

La ubicación de la banda mayoritaria de CMP, inmediatamente por encima de β–lg, está de acuerdo con lo encontrado por *Morr & Seo (1988)*. Esta banda mayoritaria se tiñó irregularmente con CB. La amplitud y la irregularidad del la misma han sido atribuidas a variaciones en el grado de glicosilación del CMP *(Nakano & Ozimek, 2000; Silva-Hernández et al., 2002)*.

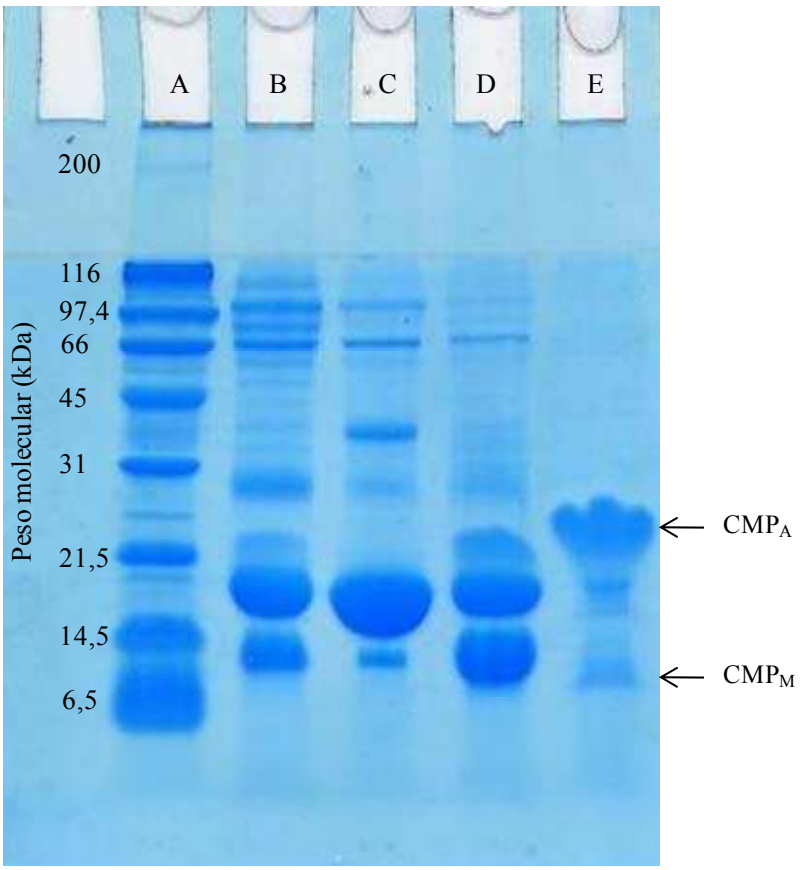


Figura I.1.17. Electroforesis SDS–PAGE de: (A) Estándares de peso molecular, (B) WPI (Arla Foods Ingredients), (C) β–lg (Davisco Foods International), (D) α–la (Arla Foods Ingredients) y (E) CMP (Davisco Foods International).

Nakano et al. (2007) analizaron el contenido de ácido siálico en cada fracción proteica obtenida en una electroforesis SDS–PAGE del mismo CMP (Davisco). De acuerdo con los resultados encontrados por estos autores, el pico de ácido siálico se encontraría en la amplia banda mayoritaria de la calle E pero también en una región con menor movilidad que no se tiñó con CB, por encima de la banda mayoritaria.

Además, en el mismo trabajo los autores mostraron que sólo una pequeña cantidad de ácido siálico fue detectado en las áreas donde se observó la mayoría de las bandas teñidas con CB en la electroforesis del CMP en acetato de celulosa. Por el contrario, la mayor parte del ácido siálico del CMP (cerca de un 70 %) se encontró en la región correspondiente a la banda más débilmente teñida con CB, que presentó la mayor movilidad.

Estos resultados sugieren que el colorante CB no es específico para las fracciones de carbohidratos de CMP. El CMP conteniendo ácido siálico y fosfato, cargado muy negativamente tiene una baja afinidad por el CB que también presenta carga negativa *(Nakano et al., 2007; Tek, Turhan & Etzel, 2006)*, por lo cual el uso de este colorante en el gel SDS–PAGE no detectaría la mayoría del CMP que contiene ácido siálico.

Considerando que el peso molecular de la forma más glicosilada del CMP glicosilado (gCMP) es alrededor de 11 kDa *(Kreuß, Strixner & Kulozik, 2009)* y el del CMP no glicosilado (aCMP) es 7 kDa, la banda amplia e irregular observada entre 23 y 28 kDa en la **Figura I.1.17**, consistiría de diferentes formas asociadas hidrofóbicamente como aCMP tetraméricos o gCMP diméricos probablemente formados durante la elaboración del queso o el procesamiento del CMP.

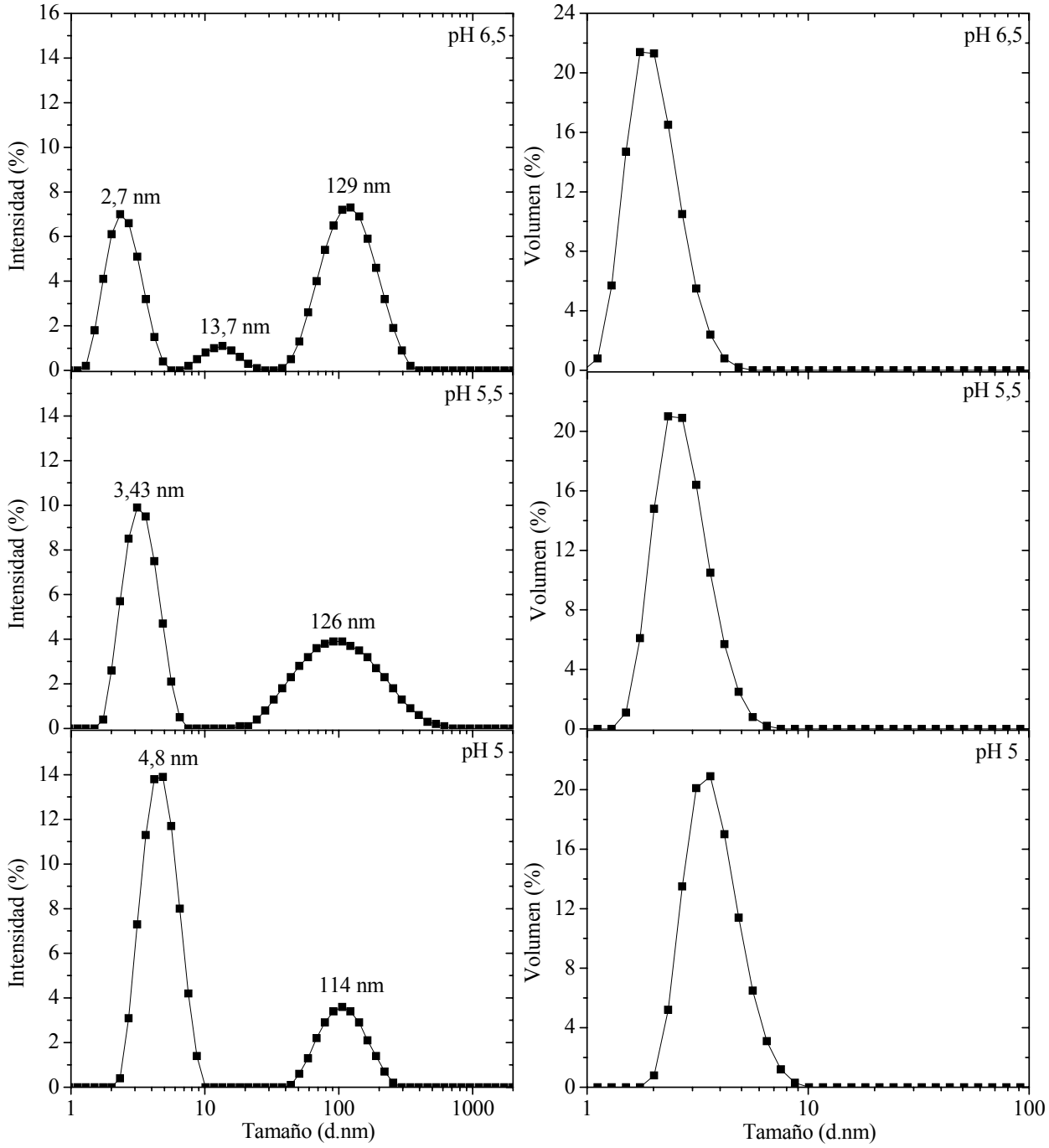
No obstante, también estarían presentes formas monoméricas de CMP que no son reveladas por la tinción con CB. Por lo tanto, la concentración real de CMP monomérico sialilado sería mucho más grande que la aparente en base a la densidad de la bandas en el análisis SDS–PAGE (*Etzel, 1999*).

I.1.2.2. Estado de asociación del CMP en función del pH.

La distribución de tamaño de partícula del CMP a diferentes pH se muestra en la **Figura I.1.18**. La distribución de tamaño de partícula por intensidad de la solución de CMP al pH original de la muestra (6,5) indicó la presencia de tres poblaciones de partículas. El diámetro hidrodinámico del pico predominante de menor tamaño se encontró entre 1 y 5 nm con un valor máximo de 2,7 nm. La estimación del peso molecular de las partículas correspondiente al máximo del pico (*d(H)* = 2,7 nm) mediante el software del Zetasizer Nano–Zs, arrojó un peso molecular cercano a 7,5 kDa que se corresponde con la forma monomérica del CMP.

Por lo tanto, en la solución de CMP a pH 6,5 predominó la forma monomérica junto con formas asociadas como dímeros, trímeros y tetrámeros los cuales tendrían *d(H)* entre 3,5 y 5 nm. Además de este pico de menor tamaño, existen otras poblaciones en la distribución por intensidad como se mencionó anteriormente, con máximos de 13,7 y 100 nm. Sin embargo, su número fue despreciable como puede deducirse de la distribución en volumen.

Los resultados de la distribución de tamaño a pH 6,5 están de acuerdo con los resultados electroforéticos ya que indican la presencia de la forma monomérica y tetramérica (incluidas ambas en el pico de menor tamaño), pero difiere en el hecho de que la electroforesis PAGE revela que la forma asociada es la predominante debido a la menor afinidad del CB por el CMP sialilado.



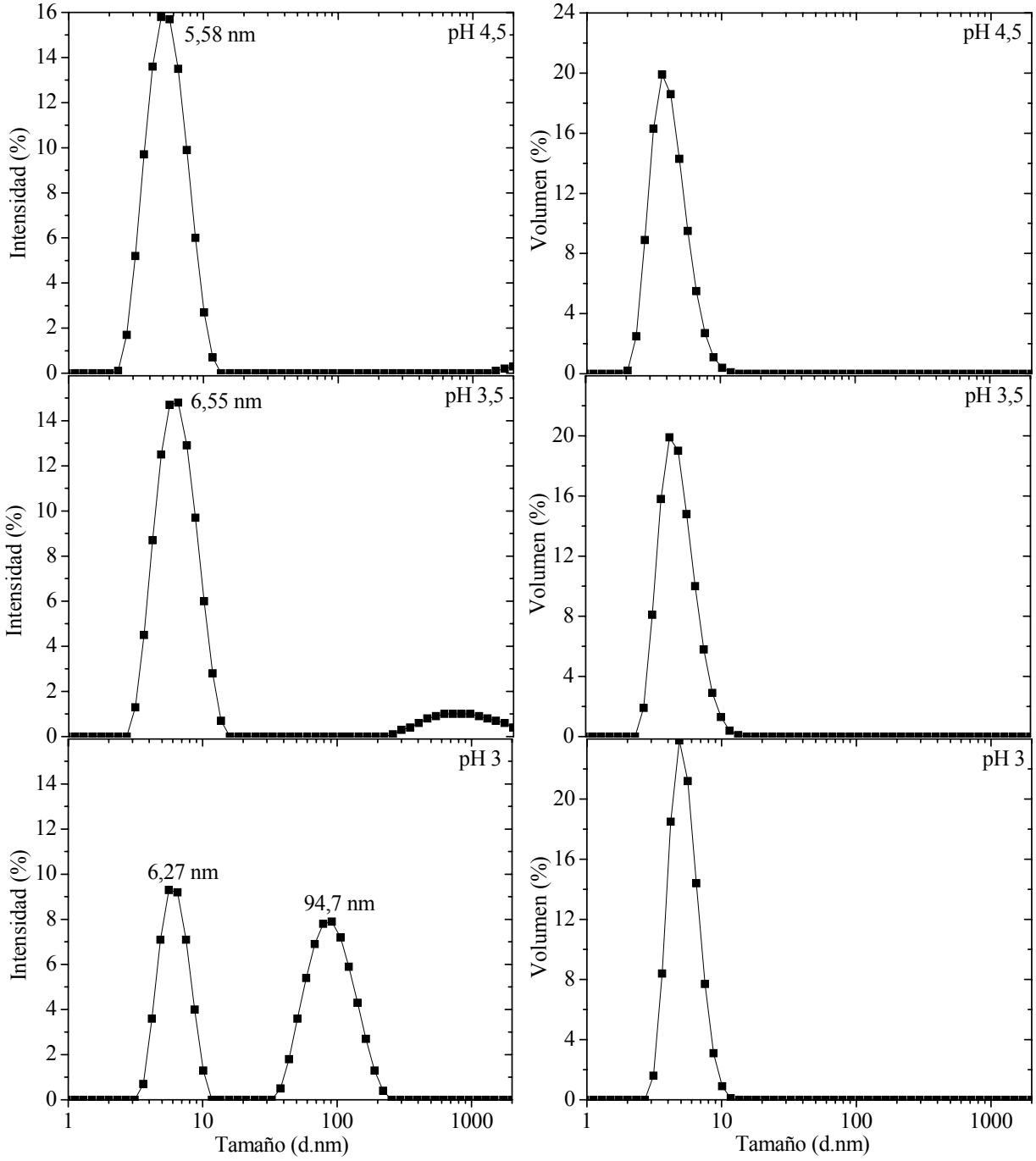


Figura I.1.18. Distribución de tamaño de partícula por intensidad (columna izquierda) y volumen (columna derecha) de soluciones de CMP al 5 % p/p inmediatamente después de ajustar el pH a diferentes valores. Temperatura 25 °C.

Silva-Hernández et al. (2002) sugirió, mediante técnicas electroforéticas, que el CMP de cabra contiene al menos dos componentes separados: uno que no se disocia y otro que se disocia en presencia de SDS, siendo este último el componente minoritario. Sin embargo, es

posible que la forma disociada de CMP reportada por *Silva-Hernández et al. (2002)* y observada en la **Figura I.1.17** no sea el componente minoritario sino que se tiña con menor intensidad que la forma asociada como se mencionó anteriormente por la menor afinidad del CB con el CMP sialilado.

Debido al efecto de la carga neta superficial, el pH tiene una gran influencia sobre las interacciones péptido–péptido *(Kreuβ et al., 2009)* y por lo tanto sobre la distribución de tamaño de partícula del CMP inmediatamente después de ajustar el pH. Así, con la disminución del pH desde 6,5 a 3, el *d(H)* del pico predominante de menor tamaño de la distribución de tamaño del CMP se desplazó a valores mayores (**Figura I.1.18**).
Además del pico de menor tamaño, en las distribuciones por intensidad, se observaron también formas más asociadas (100 – 150 nm) a todos los pH estudiados (excepto a valores cercanos al pI), pero no se tuvieron en cuenta en el análisis porque son despreciables en cantidad como puede observarse en las distribuciones por volumen (**Figura I.1.18**, columna derecha).

En la **Figura I.1.19A** se muestra ampliado el pico de menor tamaño para observar con más detalle su evolución con el pH. El *d(H)* correspondiente al valor máximo del pico de la **Figura I.1.19A** se graficó en la **Figura I.1.19B** para analizar los estados de asociación predominantes del CMP a diferentes pH. Los PM fueron estimados mediante el software del Zetasizer Nano–Zs. Se observa que a pH ácidos entre 3 y 4 predominan formas más asociadas de CMP con *d(H)* de 6 – 7 nm que corresponde a formas diméricas, tetraméricas, hexaméricas y otros oligómeros, mientras que el valor máximo por encima de pH 6 fue de 2,7 nm correspondiente a la forma monomérica del CMP.
En la misma figura se muestra también que el comportamiento a una concentración de 3 % de CMP coincide con el observado a 5 %.

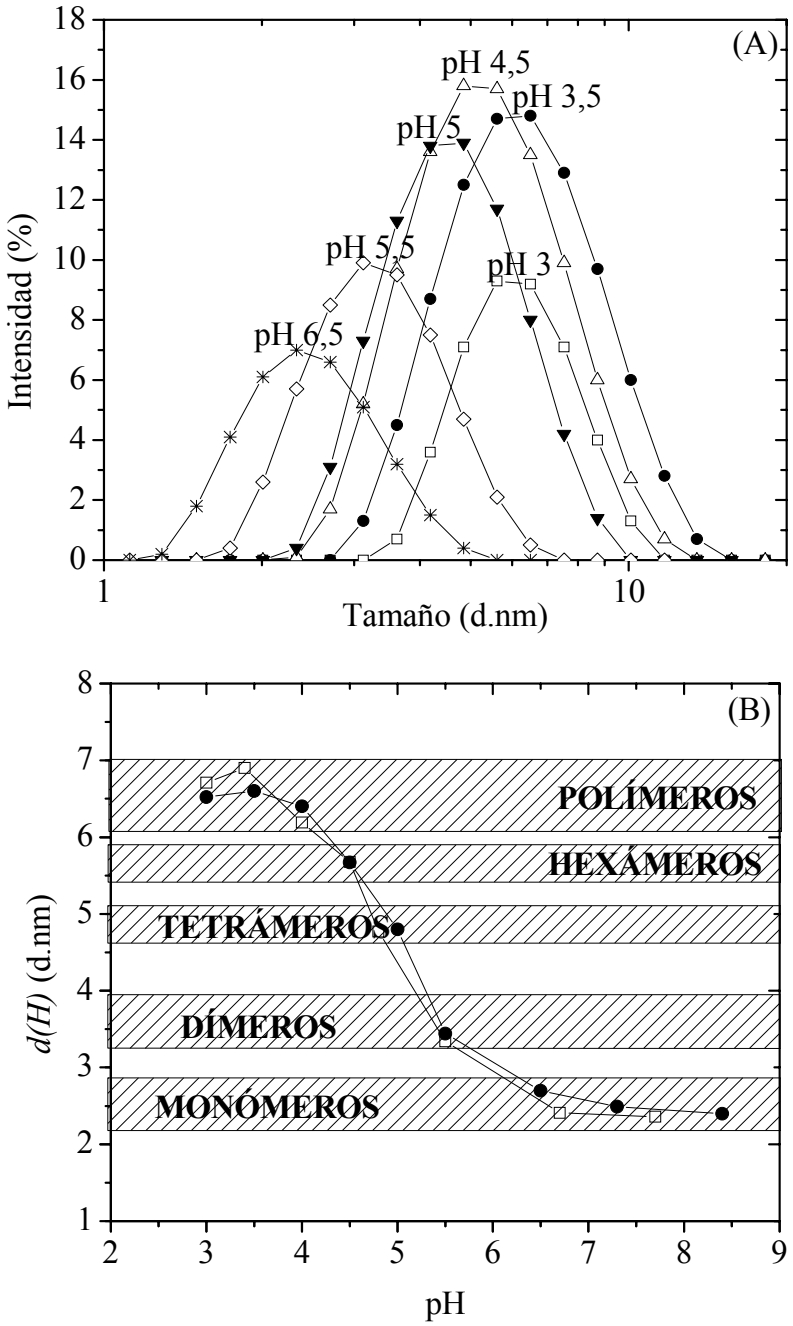


Figura I.1.19. (A) Distribución de tamaño de partícula por intensidad del pico de menor tamaño presente en soluciones de CMP al 5 % p/p inmediatamente después de ajustar el pH a: (□) 3, (●) 3,5, (△) 4,5, (▼) 5, (◇) 5,5, (✳) 6,5. (B) Tamaño del pico predominante (de la distribución de tamaño de partícula por intensidad) para soluciones de CMP. Concentración (% p/p): (□) 3 y (●) 5 en función del pH, se señala el estado de asociación estimado mediante el software del Zetasizer Nano–Zs. Temperatura 25 °C.

I.1.2.3. Autoensamblaje del CMP en el tiempo.

Luego de analizar el estado de asociación de las soluciones inmediatamente después de ajustar el pH, se estudió si dicho estado variaba con el tiempo. Se observó que solamente en las soluciones a pH por debajo de 4,5 el CMP proseguía autoensamblándose en el tiempo a temperatura ambiente.

En la **Figura I.1.20** se grafica el *d(H)* promedio del CMP (obtenido a partir del análisis de Cumulantes) para ver el aumento de tamaño con el tiempo a temperatura ambiente. De este gráfico se puede deducir que la velocidad de autoensamblaje del CMP a pH 3, 3,5 y 4, aumenta con la disminución del pH y con el aumento de la concentración de 3 a 5 % p/p.

Las formas más asociadas (100 – 150 nm) presentes en la distribuciones por intensidad, que son despreciables en volumen (**Figura I.1.18**), contribuyen a aumentar el *d(H)* promedio del CMP a valores de pH por encima de 4,5 cuando este pico llega a ser más importante (**Figura I.1.20**, t = 0). Además, el *d(H)* promedio inmediatamente después de ajustar el pH mostró un mínimo a pH 4,5 (donde no se observaron partículas de gran tamaño en las distribuciones) y un máximo a pH neutro, aunque este valor también aumentó en condiciones de pH por debajo del pI. Un comportamiento similar fue observado para 3 y 5 % de concentración aunque los valores de *d(H)* promedio a cada pH fueron levemente inferiores para las soluciones de CMP al 3 % p/p. Esto se debería a la presencia de menor cantidad de partículas asociadas o de tamaños más pequeños de CMP, indicando que la concentración es un efecto restrictivo en el autoensamblaje de CMP. Además, el *d(H)* promedio para la menor concentración de CMP estudiada (3 % p/p) (**Figura I.1.20A**) mostró valores similares a pH 3 y 3,5 para todos los tiempos estudiados, sugiriendo nuevamente el factor restrictivo de la concentración.

Por otro lado, la solución de CMP al 5 % p/p a pH 3 se autoensambló más rápidamente que el resto y a los 60 minutos mostró estructuras asociadas demasiado grandes como para ser detectados por el equipo, por ello a este pH no se presentan mediciones luego de los 40 minutos.

A pH por encima de 4 no se observó autoensamblaje en el tiempo, a temperatura ambiente, a ninguna de las concentraciones estudiadas como ya se mencionó anteriormente.

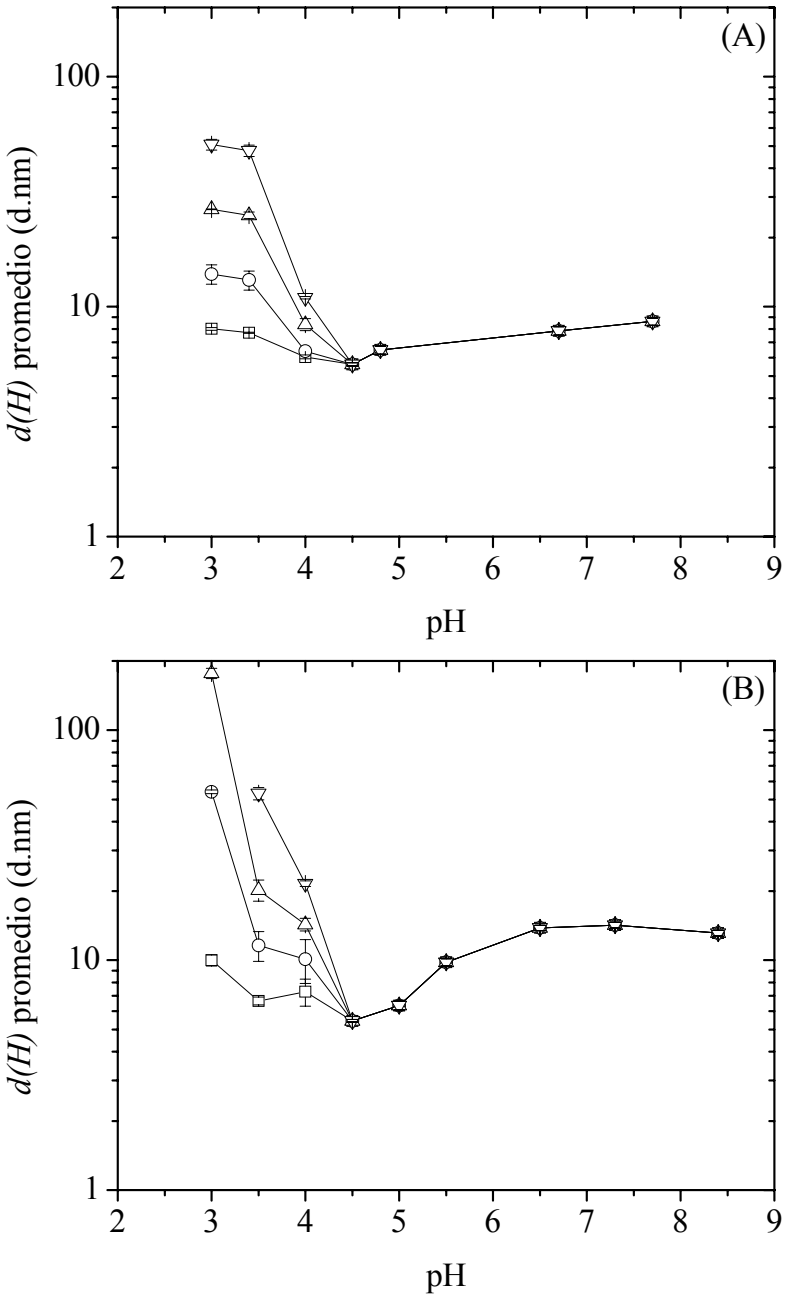


Figura I.1.20. *d(H)* promedio en función del pH en el tiempo (min): (□) 0, (○) 20, (△) 40, (▽) 60 para soluciones de CMP a concentraciones (% p/p): (A) 3 y (B) 5. Temperatura 25 °C.

Estos resultados concuerdan con estudios recientes realizados por calorimetría diferencial de barrido. *Wang (2007)* estudió al mismo CMP (de Davisco) por DSC y encontró a pH 3,5 un pico exotérmico que fue atribuido a la agregación del CMP. Sin embargo a pH 7 nosotros no

observamos ninguna transición térmica (**Figura I.1.21**) indicativa de agregación, lo cual corrobora lo observado por DLS.

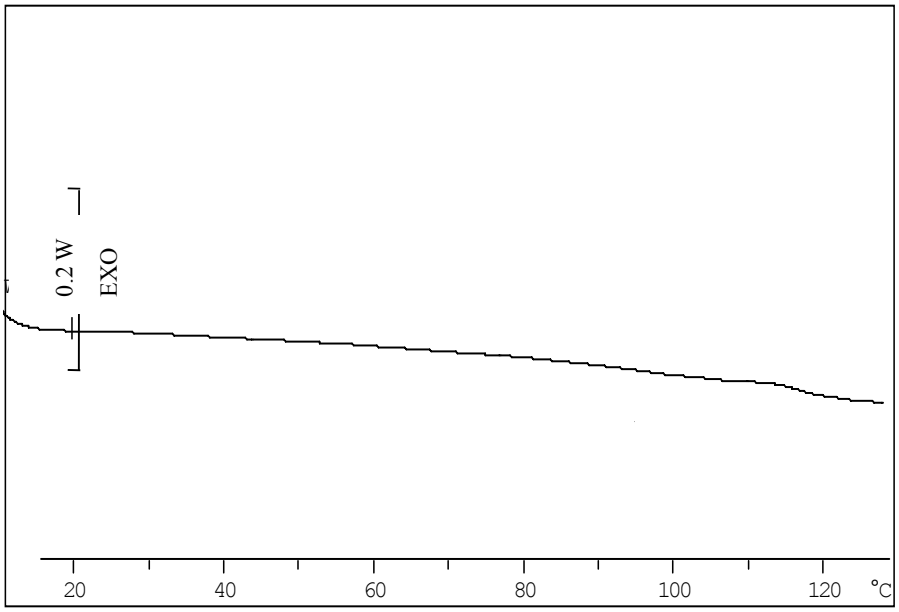


Figura I.1.21. Termograma de CMP 15 % p/p a pH 7, obtenido por DSC.

Además, la ausencia de transición endotérmica (desnaturalización) en ambas condiciones (pH 3,5 y 7) es debido a la estructura "random coil" que presenta el CMP *(Ono, Yada, Yutani & Nakai, 1987)* y a la ausencia de uniones disulfuro.

La **Figura I.1.22A** muestra, a modo de ejemplo, la evolución en el tiempo de la distribución de tamaño de partícula por intensidad de una solución de CMP a pH 4 a temperatura ambiente.
En estas condiciones, el pico de menor tamaño disminuyó su intensidad y se formaron estructuras asociadas de tamaños mayores a 200 nm, lo cual explica el aumento en el *d(H)* promedio observado en la **Figura I.1.20**.

Sin embargo, la cantidad de partículas de gran tamaño no es importante como se puede observar en la distribución por volumen (**Figura I.1.22B**). No obstante, el pico predominante de menor tamaño se movió a tamaños mayores al aumentar el tiempo, indicando el progreso de la asociación del CMP.

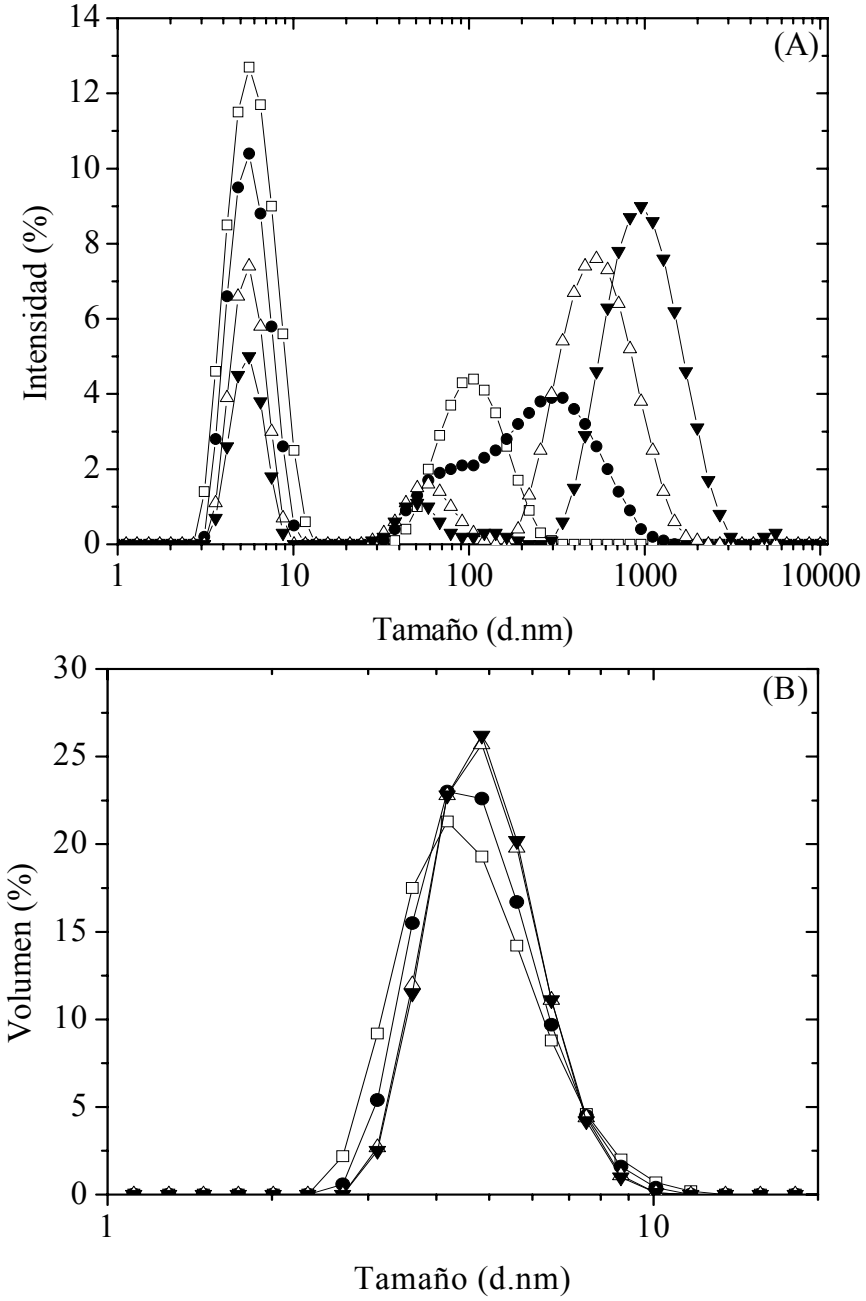


Figura I.1.22. Distribución de tamaño de partícula por (A) intensidad y (B) volumen para soluciones de CMP al 5 % p/p, a pH 4 en el tiempo (min): (□) 0, (●) 30, (△) 60, (▼) 150. Temperatura 25 °C.

I.1.2.4. Evaluación de la reversibilidad por pH del autoensamblaje del CMP.

Se estudió la reversibilidad del autoensamblaje del CMP mediante cambios en el pH. En la **Figura I.1.23A** se grafica el *d(H)* promedio del CMP siguiendo diferentes ajustes de pH

desde 7 a 3,5 (donde se lo deja un tiempo para que se promueva el autoensamblaje) y luego retornándolo a pH 7.

El *d(H)* promedio inicial a pH 7 fue 8 nm. Este valor es levemente menor que el observado para la solución al 5 % p/p, como se mostró en la **Figura I.1.20**.

Luego de ajustar el pH a 3,5, el *d(H)* promedio aumentó mucho en el tiempo (desde el minuto 10 al minuto 50 de comenzado el estudio) debido a la asociación espontánea del CMP.

Cuando la solución fue ajustada nuevamente a pH 7, luego de 50 minutos, el *d(H)* promedio disminuyó muy rápidamente hasta un valor levemente superior al inicial.

Del mismo modo en el otro eje de la misma figura se presentan los resultados obtenidos para el pico de menor tamaño de la distribución por intensidad y se observa que, como se analizó en la **Figura I.1.18** y **I.1.19**, el CMP a pH neutro presenta un pico predominante con un valor máximo de 2,5 nm (correspondiente a la forma monomérica del CMP), al bajar el pH hasta 3,5 este pico se mueve hacia tamaños más grandes (6 nm o más) y luego al retornar a pH 7 disminuye nuevamente el valor máximo de este pico predominante pero sin llegar al valor inicial correspondiente a la forma monomérica del CMP, sino que permanece constante en un valor máximo de 4 nm, correspondiente a la forma dimérica del CMP. Al comparar los valores de *d(H)* promedio y *d(H)* del primer pico se puede deducir que el constante aumento del primero, durante el tiempo que se mantiene la solución a pH 3,5, no es debido a los cambios en el primer pico sino a la formación de estructuras asociadas más grandes que crecen en cantidad y tamaño lo que genera un corrimiento del *d(H)* promedio hacia valores mayores, ya que el valor máximo del pico predominante es mayor que a pH 7, pero permanece constante durante los 50 minutos que se mantiene la solución a pH 3,5.

La **Figura I.1.23B** muestra la distribución por intensidad de la solución antes y al finalizar la experiencia. Como se dijo antes el valor final del pico de menor tamaño no coincide y tampoco las otras poblaciones presentes en la distribución. Si bien ambas distribuciones presentaron tres picos, el valor máximo del pico predominante de menor tamaño fue 2,7 nm antes de realizar este estudio y 4 nm al finalizar el estudio, lo cual correspondería a las formas monomérica y dimérica del CMP, respectivamente.

El desplazamiento en el valor del pico predominante de menor tamaño también fue observado en la distribución de tamaño de partícula por volumen (**Figura I.1.23C**). Estos resultados indicarían la estabilidad de la forma dimérica del CMP una vez formada.

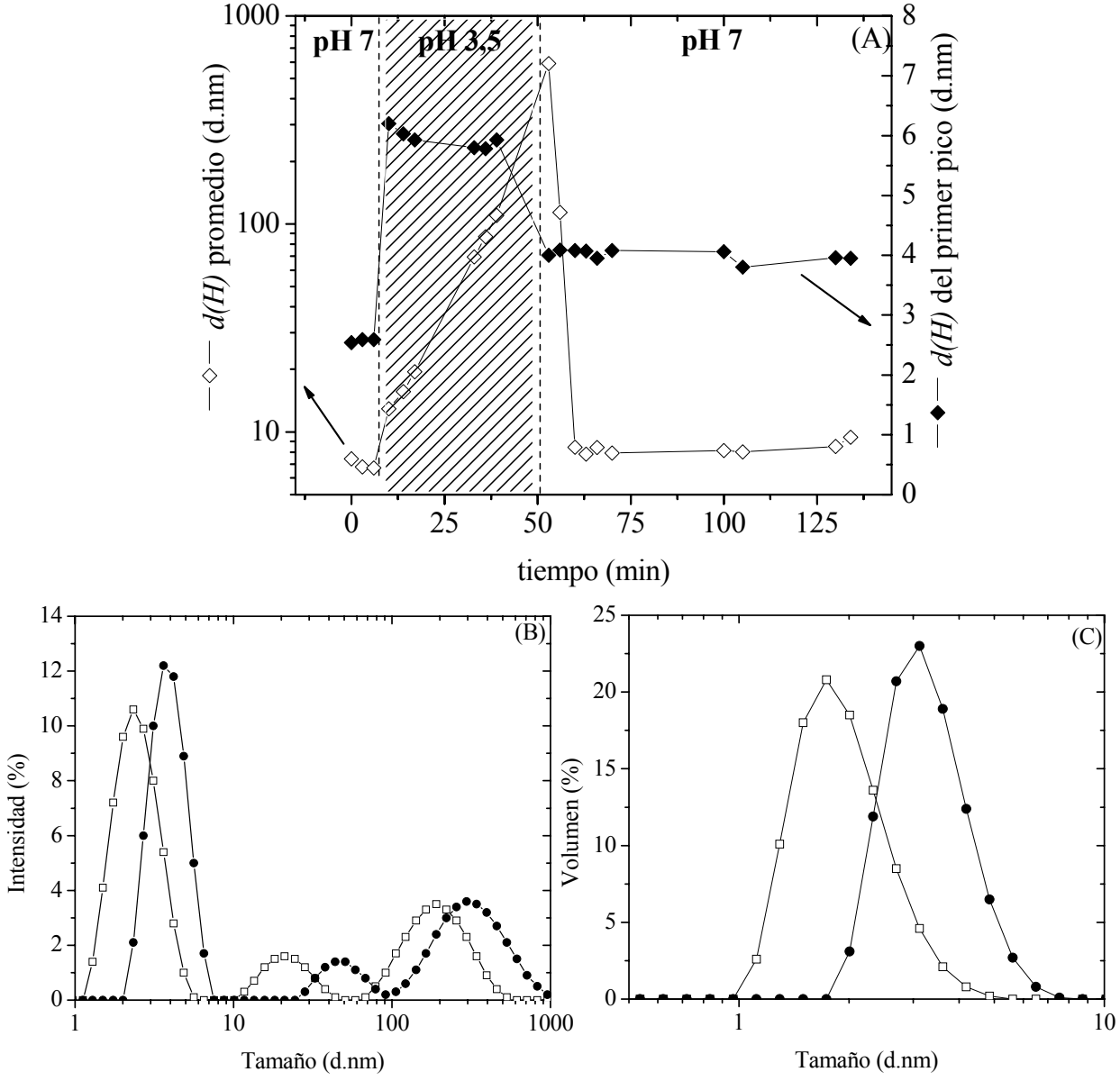


Figura I.1.23. (A) *d(H)* promedio y *d(H)* del primer pico en función del tiempo para CMP al 3 % p/p con cambios de pH desde 7 a 3,5 y luego retornando a 7, distribución de tamaño de partícula por (B) intensidad y (C) volumen para la misma solución a pH 7, (□) antes y (●) después del autoensamblaje a pH 3,5. Temperatura 25 °C.

I.1.2.5. Modelo del autoensamblaje del CMP.

Entre las diferentes interacciones que pueden promover la asociación del CMP, la formación de uniones covalentes a través de la oxidación de grupos sulfidrilos en residuos de cisteína no es posible debido a la falta de cisteína. *Mikkelsen et al. (2005)* indicó la ausencia de CMP unido covalentemente en varias fracciones SEC de CMP de κ–caseína hidrolizada por pepsina. Sin embargo, sí pueden tener lugar interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y puente hidrógeno.

El CMP es afectado por el pH ya que contiene dos residuos de Asp, siete u ocho de Glu (dependiendo de la variante B o A del CMP, respectivamente), uno de fosfo–Ser y tres de Lys. Al bajar el pH, las moléculas de CMP pierden la carga negativa de los residuos de Glu y Asp, así como los de los grupos carboxilos en el C–terminal y en los residuos de ácido siálico en gCMP.

La **Figura I.1.24** muestra el efecto del pH en el potencial zeta del CMP obtenido recientemente por *Kreuß et al. (2009)* para muestras puras de las fracciones aCMP y gCMP.

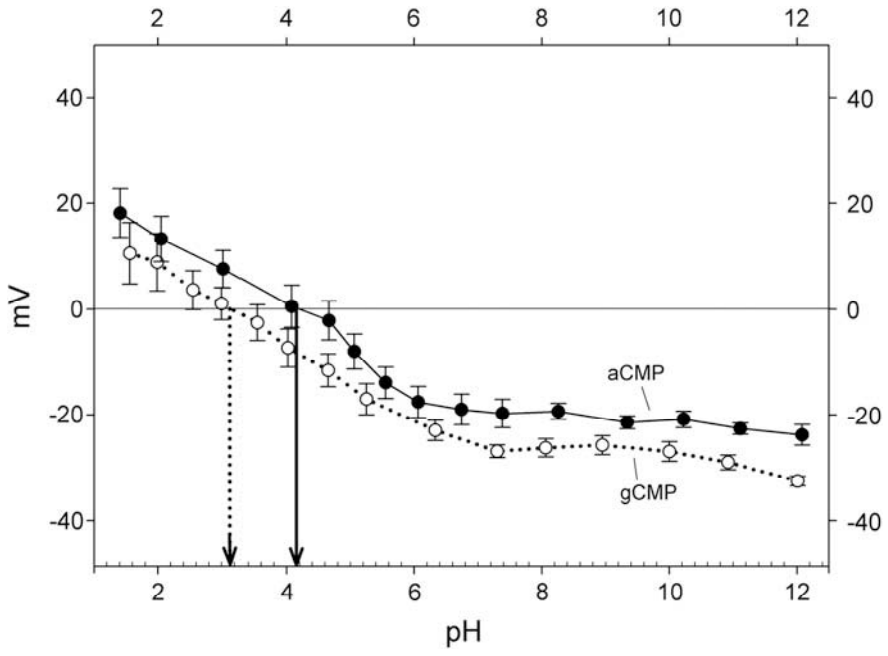


Figura I.1.24. Efecto del pH sobre el potencial zeta (mV) de soluciones puras de (●) aCMP y (○) gCMP. Se indican con flechas las posiciones de los puntos isoeléctricos *(Kreuß et al., 2009)*.

El pI del aCMP es cercano a 4,1, el cual está relacionado a la alta cantidad de aminoácidos ácidos de cadena lateral. La carga positiva de aCMP a pH menores al pI se origina de los tres residuos de Lys además del residuo N–terminal cargado positivamente, mientras que todos los residuos Glu y Asp están protonados. Por el contrario, el pI del gCMP es 3,15 ya que la carga negativa de los residuos de ácido siálico (pK del ácido siálico: 2,2) reduce la carga neta de la cadena de aminoácidos (*Kreuß et al., 2009*).

Además, en el mismo trabajo, *Kreuß et al. (2009)* presenta una estructura tridimensional del CMP obtenida mediante un software de modelado de proteínas (**Figura I.1.25**). Dicha estructura muestra las dimensiones moleculares y la densidad de carga eléctrica de la fracción aCMP (a pH 7 y fuerza iónica (*I*) = 0). También se muestra un tetrasacárido sin carga (que estaría unido al péptido si se tratara de la fracción gCMP) con el objetivo de mostrar la dimensión de la cadena de glicano respecto al péptido. Mientras que la región C–terminal y gran parte del péptido tienen una fuerte carga negativa (con una carga negativa adicional del glicano si se tratara del gCMP) hay tres pequeños dominios cargados positivamente en la zona N–terminal.

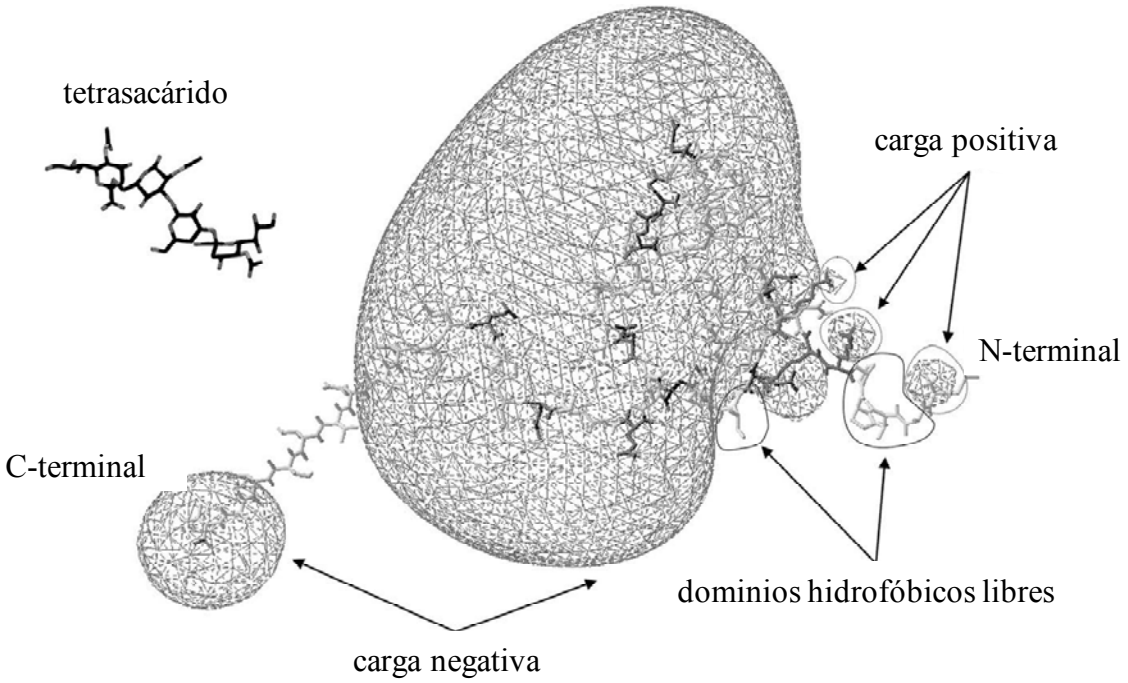


Figura I.1.25. Estructura tridimensional de aCMP y gCMP (si se une al tetrasacárido) a pH 7 (*I* = 0). Se indican las zonas C y N–terminal y los dominios hidrofóbicos libres *(Kreuß et al., 2009)*.

En base a nuestros resultados y a estudios previos *(Kreuβ, Krause & Kulozik, 2008; Kreuβ et al., 2009)* se propone un modelo para explicar el autoensamblaje del CMP que finalmente conduce a la formación de geles a temperatura ambiente. La **Figura I.1.26** muestra un esquema del autoensamblaje del CMP dependiente del pH.

La mayoría de los dominios hidrofóbicos del CMP (AA 1–5, 17–22, 35–39 y 58–65) están enmascarados por la fuerte densidad de carga de los residuos Glu y Asp en un amplio rango de pH neutro y básico para ambas fracciones. Por lo tanto los dominios hidrofóbicos no pueden interactuar. Este efecto es más pronunciado para gCMP debido a la carga negativa de los residuos de ácido siálico. Como fue mostrado por *Kreuβ et al. (2009)*, por encima de pH 6,5, cuando todas las cadenas de aminoácidos ácidos están deprotonadas el potencial zeta permanece relativamente estable a –20 mV para aCMP y –30 mV para gCMP (**Figura I.1.24**). Por lo tanto, por encima de pH 6,5, el autoensamblaje del CMP se prevendría debido al apantallamiento por la fuerte carga negativa, la cual es más pronunciada para gCMP, predominando la forma monomérica de CMP (**Figura I.1.18**).

Disminuyendo el pH por debajo de 6,5, hay una fuerte disminución del valor absoluto del potencial zeta hasta el pI (**Figura I.1.24**) (*Kreuβ et al., 2009*) debido a un aumento de la protonación de las cadenas de aminoácidos acídicos. Por lo tanto, el apantallamiento por las cargas negativas comienza a disminuir permitiendo que el dominio hidrofóbico terminal (AA 1–5), que no está apantallado por carga negativa, interactúe primero, seguido por dominios hidrofóbicos ubicados en el centro de la cadena peptídica.

Por lo tanto, a pH menor a 6,5 ocurriría una primera etapa de autoensamblaje del CMP inducido por pH para formar dímeros por medio de interacciones de los dominios hidrofóbicos (etapa 1 en **Figura I.1.26**). Estas estructuras, una vez formadas, son estables a cambios de pH como se mostró en los estudios de reversibilidad (**Figura I.1.23**).

Esto revela una interacción fuerte entre los dominios hidrofóbicos por debajo de este pH. La estabilidad de la forma dimérica del CMP fue reportada previamente por *Mikkelsen et al. (2005)* quienes encontraron a pH 3,4 formas asociadas de 35 y 18 por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC, por su sigla en inglés). Considerando que el PM del CMP es aproximadamente 7 kDa, *Mikkelsen et al. (2005)* concluyó que el CMP existe como tetrámeros, dímeros y monómeros. Sin embargo, el análisis SDS–PAGE de las fracciones separadas por SEC revelaron una sola banda a 18 kDa sugiriendo que la forma dimérica del CMP es resistente a la disociación.

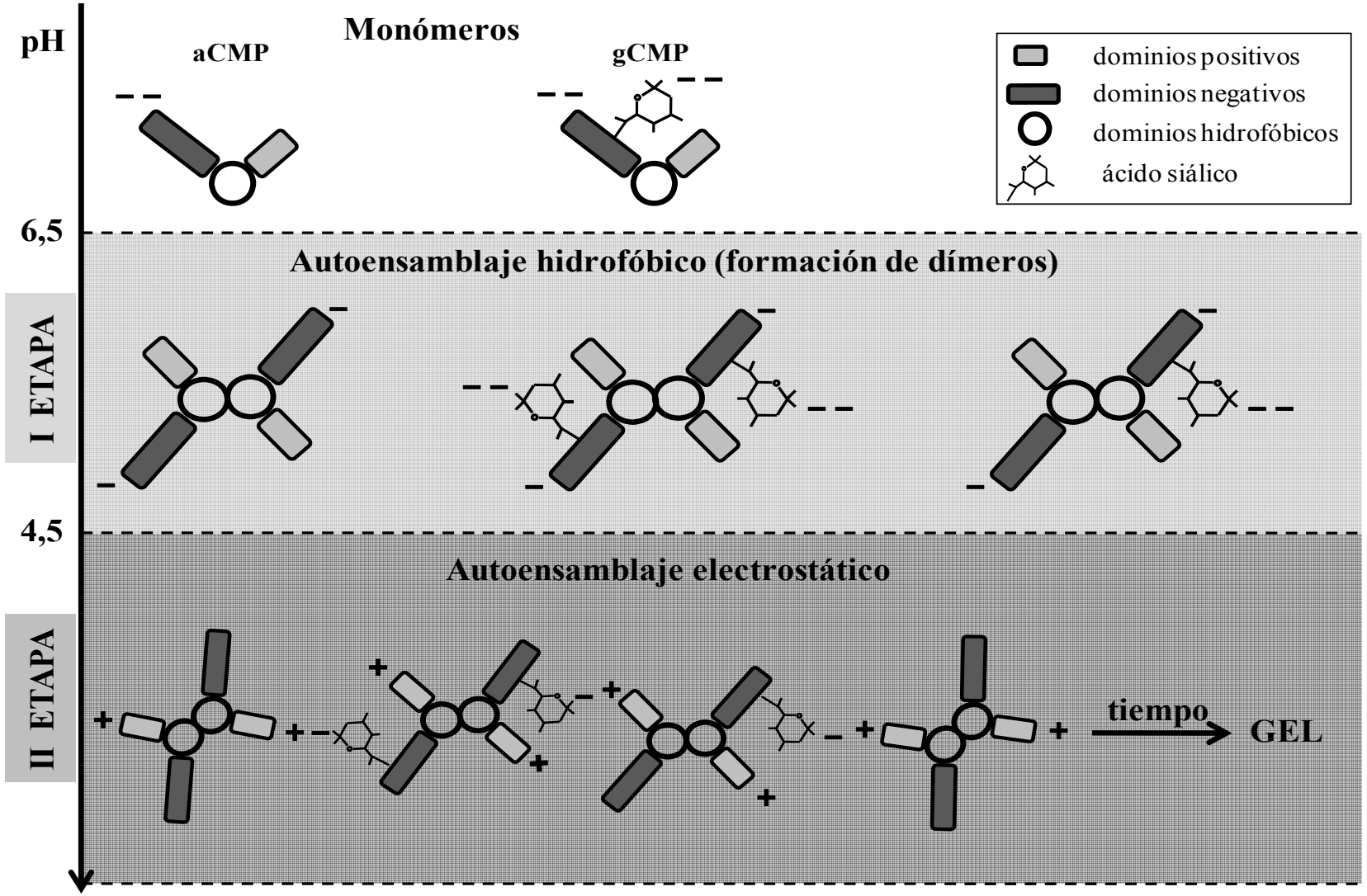


Figura I.1.26. Esquema del modelo propuesto para explicar el autoensamblaje de CMP dependiente del pH y la formación de geles a temperatura ambiente.

Una segunda etapa del autoensamblaje ocurriría por interacciones electrostáticas por debajo de pH 4,5 entre dímeros de aCMP con una carga neta positiva y gCMP cargado negativamente (etapa 2 en **Figura I.1.26**).

La variante genética B aCMP es menos ácida que el A aCMP, no presentando carga a pH alrededor de 4,3 – 4,6. Sólo a pH 4,0 – 4,1 todo el aCMP está sin carga mientras que el gCMP retiene una carga neta negativa debido al residuo del ácido siálico. Como fue reportado en la bibliografía, gCMP tiene una composición heterogénea con grandes cantidades de grupos fosfatos y glicanos, especialmente el ácido siálico altamente cargado *(Kreuβ et al., 2008)*. Se han identificado cinco O–glicanos diferentes unidos covalentemente a residuos de treonina o serina *(Holland, Deeth & Alewood, 2006)*. En la mayoría de los casos, el ácido siálico altamente cargado es el carbohidrato terminal.

Al disminuir el pH por debajo de 4, las isoformas de gCMP menos ácidas alcanzan su estado isoeléctrico y a pH 3,15 todo el gCMP está en el estado isoeléctrico *(Kreuβ et al., 2009)*. No obstante, debido al bajo pK de los residuos de ácido siálico (2,2) existirían cargas negativas locales ubicadas sobre los glicanos hasta pH 2,2, permitiéndole interactuar con cargas positivas. Así, en el rango de pH 2 – 4,5 puede ocurrir el autoensamblaje a través de uniones electrostáticas hasta formar estructuras gelificadas con el tiempo.

I.1.2.6. Efecto del tratamiento térmico en el autoensamblaje del CMP.

Las soluciones de CMP a pH mayor a 4 no mostraron cambios en las distribuciones de tamaño de partícula con el tratamiento térmico. Es importante recordar que en este rango de pH las soluciones de CMP tampoco mostraron formación de estructuras autoensambladas en el tiempo a temperatura ambiente (**Figura I.1.20**).

En cambio, las distribuciones de tamaño a pH menor o igual a 4 sí se modificaron con el incremento de la temperatura. Este comportamiento era de esperar ya que el CMP en estas condiciones formó estructuras autoensambladas en el tiempo a temperatura ambiente (**Figura I.1.20**).

A modo de ejemplo, en la **Figura I.1.27** se muestra la distribución por intensidad y volumen de una solución de CMP 3 % p/p a pH 3,5 durante el tratamiento térmico. En la **Figura I.1.27A** se puede observar una disminución continua de la intensidad del pico de menor tamaño y que los picos de las formas agregadas se movieron hacia tamaños mayores. Sin

embargo, estos agregados sólo son importantes en cantidad a partir de los 55 °C, temperatura a partir de la cual se observaron también en la distribución por volumen (**Figura I.1.27B**). Por encima de 50 °C desaparece por completo el primer pico tanto en la distribución por intensidad como en la distribución por volumen.

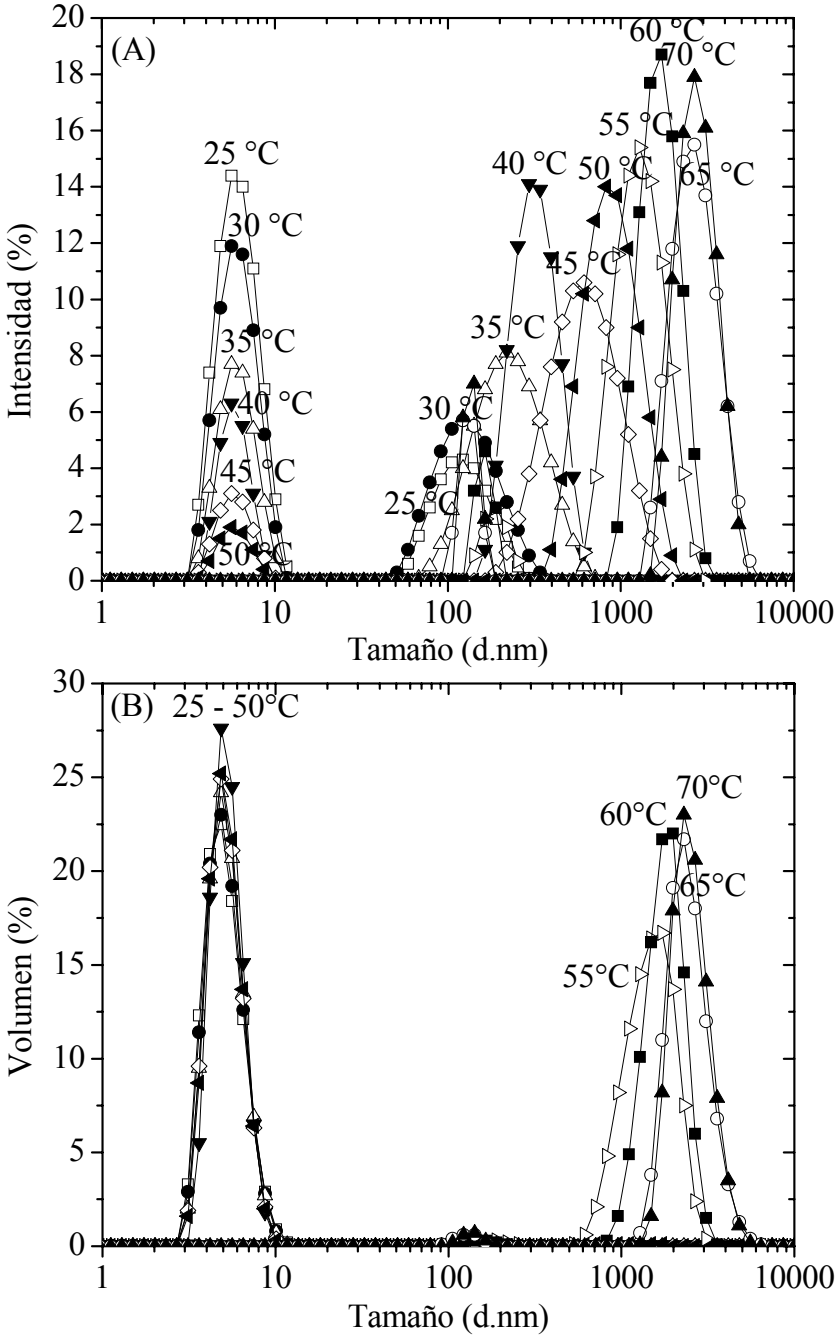


Figura I.1.27. Distribución de tamaño de partícula por (A) intensidad y (B) volumen de una solución de CMP al 3 % a pH 3,5 sometida a tratamiento térmico desde 25 hasta 70 °C: (□) 25, (●) 30, (△) 35, (▼) 40, (◇), 45, (◀) 50, (▷) 55, (■) 60, (○) 65, (▲) 70 °C.

La **Figura I.1.28** presenta el cambio del *d(H)* promedio con el aumento de la temperatura de calentamiento para una solución a pH 3,5 y a 6,5.

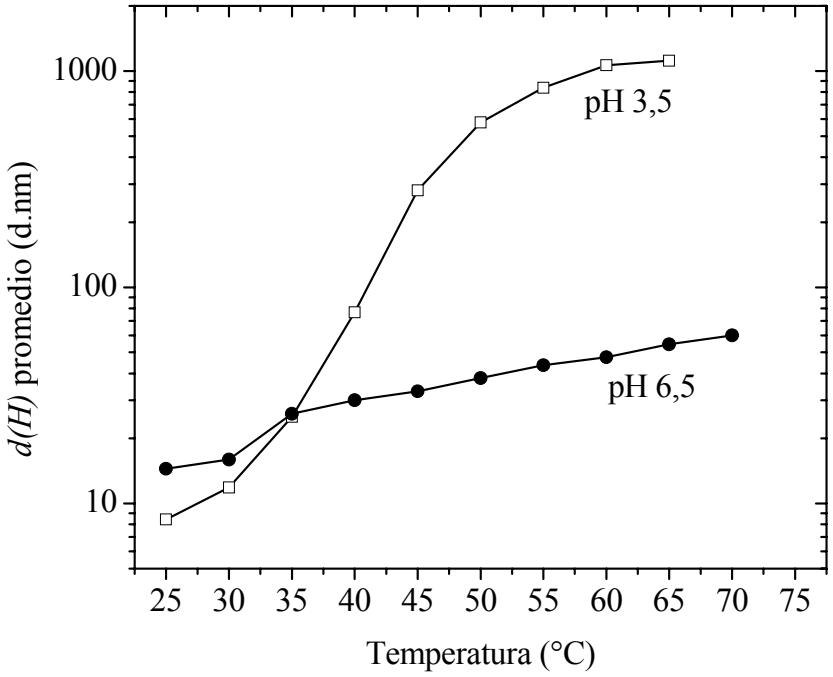


Figura I.1.28. *d(H)* promedio en función de la temperatura para soluciones de CMP 3 % p/p a pH: (□) 3,5 y (●) 6,5.

Como se dijo antes, las soluciones a pH 6,5 no mostraron modificación en sus distribuciones con el incremento de la temperatura, sin embargo, el valor del *d(H)* promedio aumentó, quizás debido a leves cambios en la posición de los picos, sobre todo de los de mayor tamaño o por la agregación de la β–lg contaminante que presenta el CMP de Davisco (**Figura I.1.17**).
En cambio, las soluciones a pH 3,5, debido a los grandes cambios que se presentaron en las distribuciones (**Figura I.1.27**), mostraron un gran aumento en el *d(H)* promedio con el incremento de la temperatura.

Se estudió la posible reversibilidad de los agregados formados al ocurrir un enfriamiento posterior al tratamiento térmico (**Figura I.1.29**).
El *d(H)* promedio (**Figura I.1.29A**) de las soluciones a pH mayor a 4, al enfriar a 25 °C retornó prácticamente a su valor original, revirtiendo la agregación aparente mostrada en el cambio de *d(H)* promedio con el incremento de la temperatura. Se habla de agregación

aparente porque al analizar las distribuciones de estas soluciones a pH mayor a 4 durante el calentamiento, prácticamente no se observaron cambios.

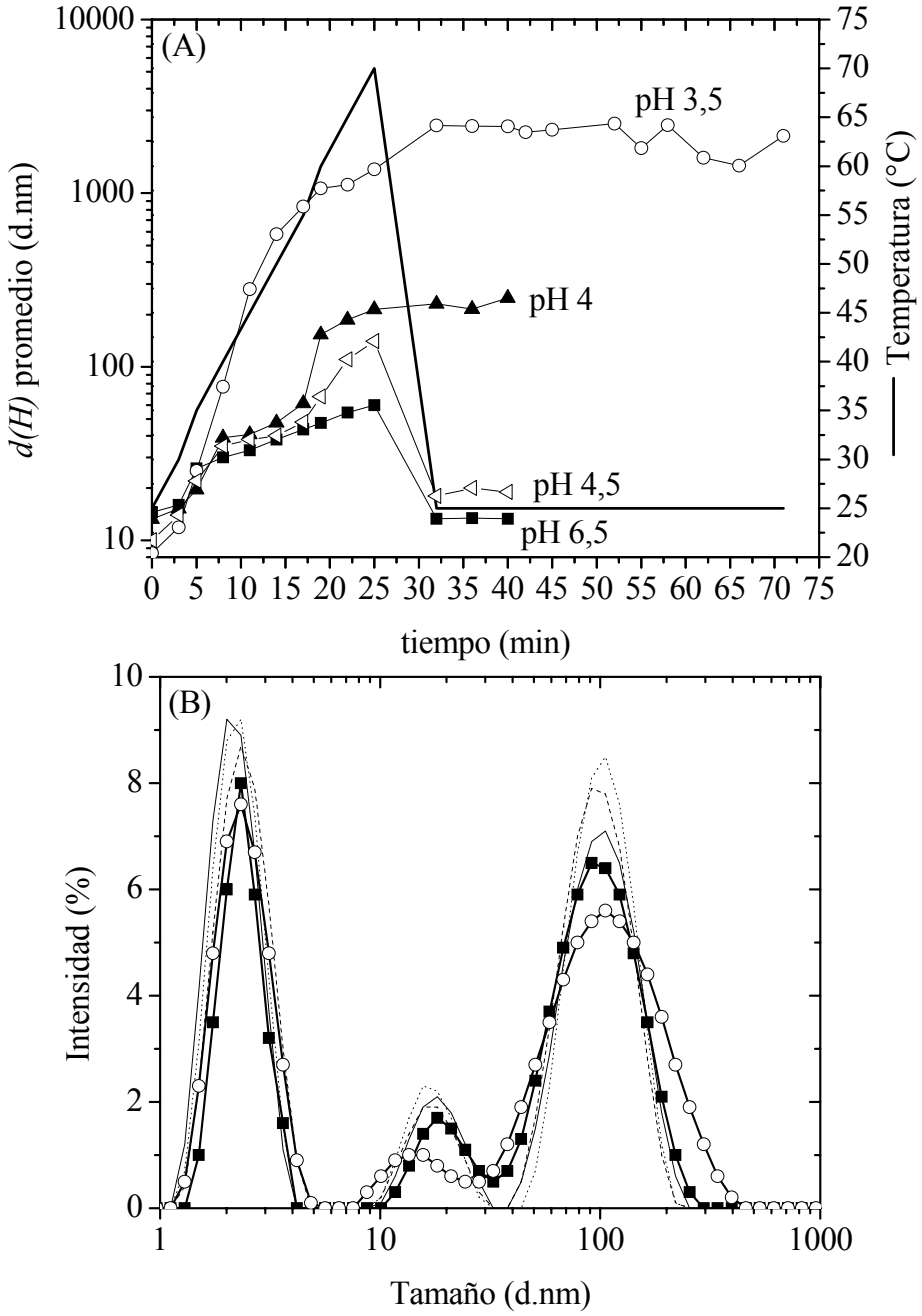


Figura I.1.29. (A) Cambio del *d(H)* promedio durante el calentamiento y el posterior enfriamiento en soluciones de CMP al 3 % p/p a pH: (○) 3,5, (▲) 4, (◁) 4,5 y (■) 6,5. (B) Distribución de tamaño de partícula por intensidad de la solución de CMP al 3 % p/p a pH 6,5 a diferentes temperaturas durante el calentamiento: (■) 25 °C antes de empezar el calentamiento, (- - -) 50 °C, (· · ·) 60 °C, (—) 70 °C y (○) 25 °C luego del enfriamiento.

A modo de ejemplo, se muestra en la **Figura I.1.29B**, la distribución de tamaño de partícula por intensidad de la solución de CMP a pH 6,5, antes y durante el calentamiento y luego del enfriamiento y se observa que los mayores cambios ocurren en el pico de mayor tamaño lo que podría generar esos cambios en el *d(H)* promedio como se mencionó anteriormente. Sin embargo, no son cambios tan rotundos como los ocurridos a pH menores a 4 (**Figura I.1.27**).
En cambio, las soluciones a pH 4 y menores mantuvieron el valor de *d(H)* promedio que presentaron al final del calentamiento, sugiriendo que los agregados formados a esos pH son estables a la disminución de la temperatura (**Figura I.1.29A**).
Estos resultados indicarían que la agregación térmica del CMP ocurriría a valores de pH < 4,5 en forma similar a lo mostrado a temperatura ambiente.

Se estudió la reversibilidad por pH, de los agregados formados por el tratamiento térmico a pH 3,5. Los resultados obtenidos en cuanto al diámetro promedio y al diámetro del primer pico se presentan en las **Figura I.1.30**.

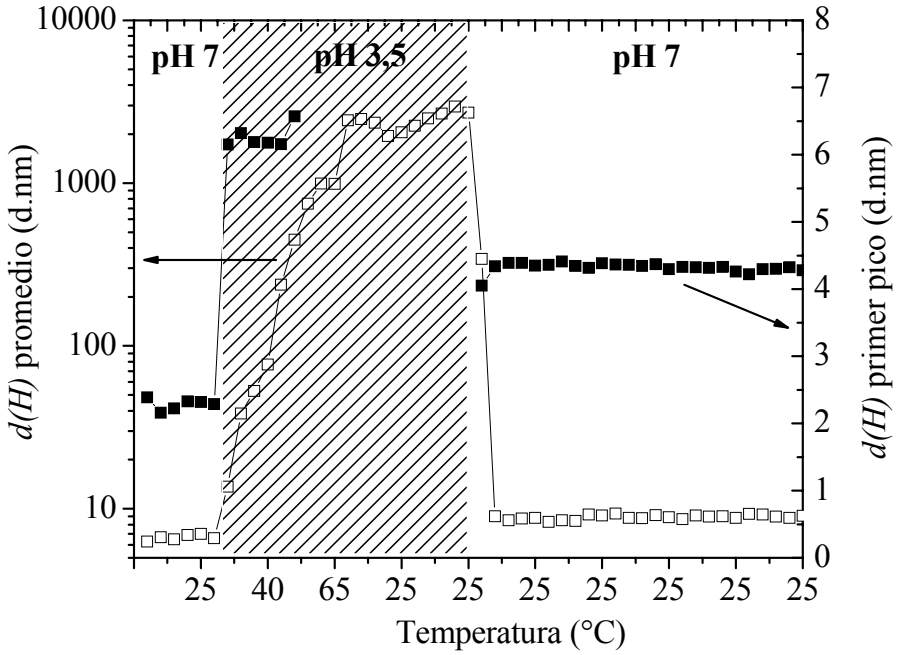


Figura I.1.30. Evolución del (□) *d(H)* promedio y (■) *d(H)* del primer pico de la distribución por intensidad de CMP al 3 % p/p en función de la temperatura, con cambios de pH desde 7 (a 25 °C) a 3,5 (desde 25 a 65 °C y posterior enfriamiento a 25 °C) y luego retornando a pH 7 (a 25 °C).

La solución inicialmente a pH 7 presentó un *d(H)* del primer pico de alrededor de 2,5 nm a 25 °C, tamaño que corresponde a la forma monomérica como fue explicado ampliamente en la **Figura I.1.18**. El *d(H)* promedio a 25 °C también es el analizado anteriormente, cercano a 6 – 7 nm, valor elevado por la presencia de las formas agregadas observadas en esta solución de CMP. Al disminuir el pH a 3,5 y comenzar el tratamiento térmico, aumentan los valores de ambos parámetros, alcanzando el *d(H)* promedio valores de 2000 nm y un valor relativamente constante de 6,5 nm el *d(H)* del primer pico hasta una temperatura a la cual desaparece ese primer pico y todo el CMP parece estar en forma de grandes agregados, razón por la cual no se muestran estos datos en el gráfico. Dicha temperatura es alrededor de los 50 °C (**Figura I.1.27**). Después de terminado el tratamiento térmico, se enfría hasta 25 °C manteniendo la solución a pH 3,5 y durante ese período el valor del *d(H)* promedio permanece contante como también se mostró en la **Figura I.1.29**. El valor del *d(H)* del primer pico sigue sin mostrarse en el gráfico debido a que desaparece por completo.

Luego de un tiempo a 25 °C y pH 3,5, se aumentó el pH de la solución a 7 y se observó una disminución brusca tanto en el *d(H)* promedio como en el *d(H)* del primer pico, alcanzando ambos, valores un poco superiores a los originales a pH 7.
El valor del *d(H)* promedio fue cercano a 9 – 10 nm y el valor del primer pico fue de alrededor de 4,25 nm, valor coincidente con el encontrado al revertir el autoensamblaje de una solución de CMP a pH 3,5 a temperatura ambiente. Esto indicaría nuevamente que también la agregación térmica a pH 3,5 formaría dímeros estables a posteriores cambios de pH.

En la **Figura I.1.31** se muestran las distribuciones de tamaño de partícula de CMP a pH 7 a 25 °C antes y después de bajar el pH a 3,5 y someterlo a tratamiento térmico.
Al comparar estos resultados con los mostrados en la **Figura I.1.23B** y **C**, donde se analizaba la solución a pH 7 también, antes y después del autoensamblaje de CMP a pH 3,5 sin tratamiento térmico, encontramos que las distribuciones obtenidas fueron muy semejantes.
Esto sugiere que, aún cuando el tratamiento térmico a pH < 4,5 (por ejemplo, 3,5) promueve la formación de agregados de CMP que se mantienen estables al enfriar a temperatura ambiente, éstos revierten por acción del pH hasta formas diméricas (4,25 nm) estables.

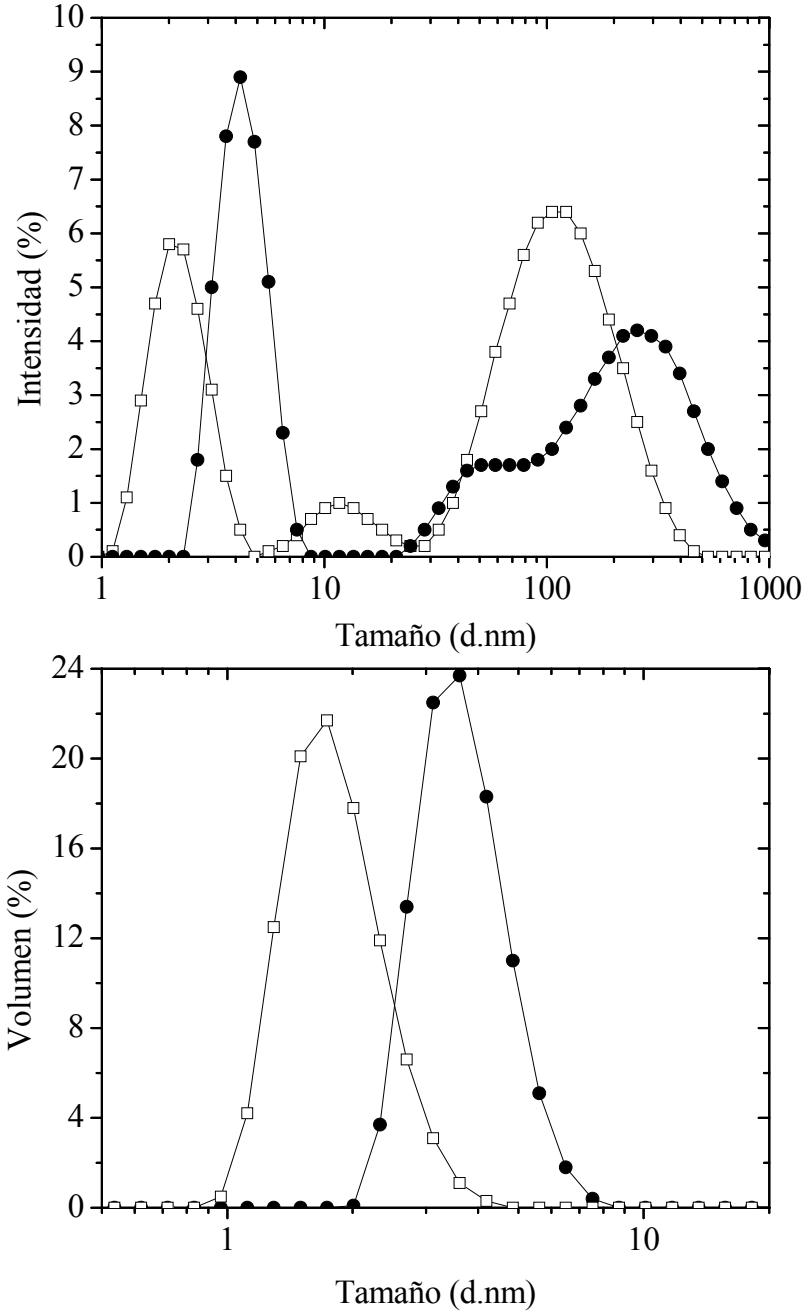


Figura I.1.31. Distribución de tamaño de partícula por (A) intensidad y (B) volumen de una solución de CMP 3 % p/p a pH 7, (□) antes y (●) después de la agregación térmica a pH 3,5. Temperatura 25 °C.

Esto indicaría que el mecanismo de autoensamblaje del CMP a pH < 4,5 postulado a temperatura ambiente (**Figura I.1.26**) no se vería modificado por el tratamiento térmico. El aumento de temperatura aceleraría la primera etapa de asociación del CMP por interacciones

hidrofóbicas ya que éstas se ven favorecidas a altas temperaturas *(Bryant & McClements, 1998)*.

La **Figura I.1.32** muestra la evolución del *d(H)* promedio de CMP a pH 3,5 en el tiempo, con y sin tratamiento térmico (datos de las **Figuras I.1.20A** y **I.1.27A** para CMP 3 % pH 3,5 sin y con tratamiento térmico, respectivamente) con el objetivo de mostrar el efecto que ejerce la temperatura sobre la velocidad de asociación/autoensamblaje. Es posible observar que bajo tratamiento térmico el CMP se asocia rápidamente hasta llegar a un valor prácticamente constante (*d(H)* = 2100 nm) luego de 30 minutos, mientras que a temperatura ambiente la asociación es más lenta y no se alcanza a observar un plateau en el tiempo de medición.

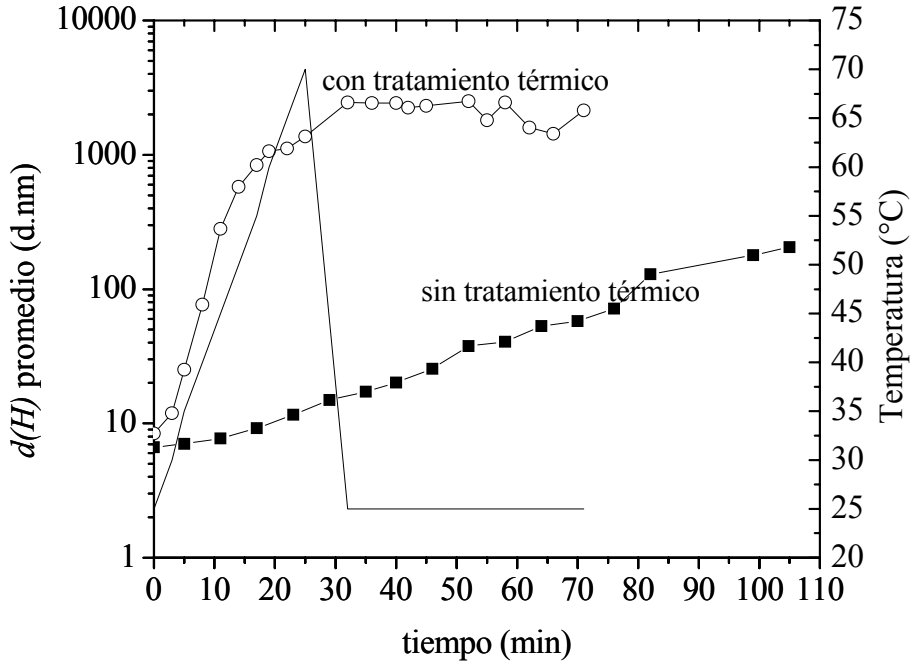


Figura I.1.32. Evolución del *d(H)* promedio en el tiempo de CMP 3 % a pH 3,5 (○) con y (■) sin tratamiento térmico hasta 70 °C. Se indica la rampa de calentamiento (—).

Numerosos autores han informado que el CMP es estable frente al tratamiento térmico *(Brody, 2000; Moreno, López Fandiño & Olano, 2002)*. Sin embargo, los resultados presentados en este apartado muestran que este péptido es estable a tratamientos térmicos en soluciones a pH por encima de 4,5. Mientras que a pH cercano al valor del pI y por debajo del mismo es afectado por la temperatura agregándose de forma irreversible por cambios de temperatura.

Estos resultados están de acuerdo con *Lieske, Konrad & Kleinschmidt (2004)* quienes estudiaron la influencia del pH y el calentamiento sobre la aislación de CMP por ultrafiltración del suero y verificaron que el CMP aumenta su sensibilidad al calor a pH ácidos (entre 3,8 y 5,2), mientras que a pH neutro no encontraron cambios significativos. Este comportamiento a pH neutro también fue observado por *Thomä-Worringer, Sørensen & López Fandiño (2006)* calentando a 95 °C durante 5 minutos a pH neutro. En este punto es importante tener en cuenta que en la muestra de CMP existen contaminaciones de otras proteínas del suero, por ejemplo de β–lg, como se vio en la **Figura I.1.17**. La presencia de β–lg en soluciones de CMP a temperatura ambiente sólo tendría cierto efecto a pH cercanos al pI de β–lg; sin embargo, existiría un efecto mayor con el aumento de la temperatura ya que dicha proteína mostró agregación a todos los pH bajo tratamiento térmico. Esto podría explicar el hecho de que las soluciones de CMP a pH mayores a 4,5 mostraron un cambio en el *d(H)* promedio con el calentamiento aunque luego de enfriarlas volvieron prácticamente a su tamaño original, quizás porque la concentración de β–lg contaminante es muy pequeña como para mantener el cambio en la solución total. En el próximo apartado de este mismo capítulo se verá más en detalle el efecto de la presencia de β–lg en soluciones de CMP.

Por otro lado, la agregación observada a pH por debajo del pI mostró no ser reversible por cambios de temperatura, pero sí por cambios de pH como observamos en el estudio de reversibilidad con pH (**Figuras I.1.30** y **I.1.31**). Aunque como se observó la reversibilidad no es completa, ya que no se revierte hacia la forma monomérica original sino hacia una forma dimérica. Este dímero parece ser estable a los cambios de pH, tanto luego del autoensamblaje a temperatura ambiente, como luego de la agregación ocurrida al someter la solución a un tratamiento térmico. Otros autores han encontrado también formas asociadas resistentes a cambios en el pH pero no son dímeros, sino trímeros y tetrámeros. *Nakano & Ozimek (1998)* fraccionaron el CMP por técnicas cromatográficas y sugirieron que el CMP obtenido es una estructura asociada de tres monómeros y que su peso molecular no fue afectado por cambios en el pH. *Mikkelsen et al. (2005)* demostraron en sus estudios que el peso molecular experimental del CMP es superior al peso molecular teórico debido a la asociación de monómeros de CMP y sugirieron que el CMP puede asociarse en hasta cuatro monómeros los cuales son resistentes a cambios de pH.

I.1.3. Caracterización de sistemas mixtos CMP:β–lg a pH 7 y 3,5.

En este apartado se estudió la existencia de interacciones asociativas entre CMP y β–lg (de Davisco) en solución a temperatura ambiente y bajo tratamiento térmico a pH 7 y 3,5 por dispersión dinámica de luz y por métodos complementarios como calorimetría diferencial de barrido y electroforesis PAGE en condiciones nativas.

I.1.3.1. Tamaño promedio y distribución de tamaño de partícula a temperatura ambiente en soluciones mixtas a pH 7.

En la **Figura I.1.33** se muestra la distribución de tamaño de partícula por intensidad y volumen, respectivamente, de soluciones de β–lg (A y B) y CMP (E y F) (CMP:β–lg 0:100 y 100:0, respectivamente) en comparación con los sistemas mixtos (C y D) (CMP:β–lg 25:75, 50:50 y 75:25) a temperatura ambiente y pH 7.

La distribución de tamaño de partícula por intensidad de la solución de β–lg sola presenta dos picos, uno correspondiente a los valores de la β–lg monomérica y otro en valores mayores a 10 nm. Estos resultados coinciden con los mostrados en la **Figura I.1.10**, que corresponde a una concentración de β–lg de 3 % p/p. Como fue explicado anteriormente, la población de tamaños mayores a 10 nm es despreciable en cantidad como puede observarse en la distribución por volumen donde sólo aparece la población de tamaños menores.

La solución de CMP (sistema 100:0) presenta el pico principal en intensidad correspondiente a la forma monomérica de este péptido y otro pico minoritario en tamaños mayores en la distribución por intensidad pero este último es también despreciable según la distribución de volumen como fue explicado ampliamente en la **Figura I.1.18**.

Al analizar las distribuciones de intensidad de los sistemas mixtos CMP:β–lg 25:75, 50:50 y 75:25 se observó que las mezclas presentaron distribuciones bimodales con un pico mayoritario en intensidad en tamaños entre 2 y 30 nm de diámetro con valores máximos de pico en 5,6 nm para la solución con mayor cantidad de CMP (75:25) y de 6,5 nm para las otras dos soluciones (50:50 y 25:75). Este pico para los tres sistemas mixtos corresponde a partículas de tamaños mayores que las soluciones de CMP y β–lg solos lo cual sugeriría la existencia de formas asociadas.

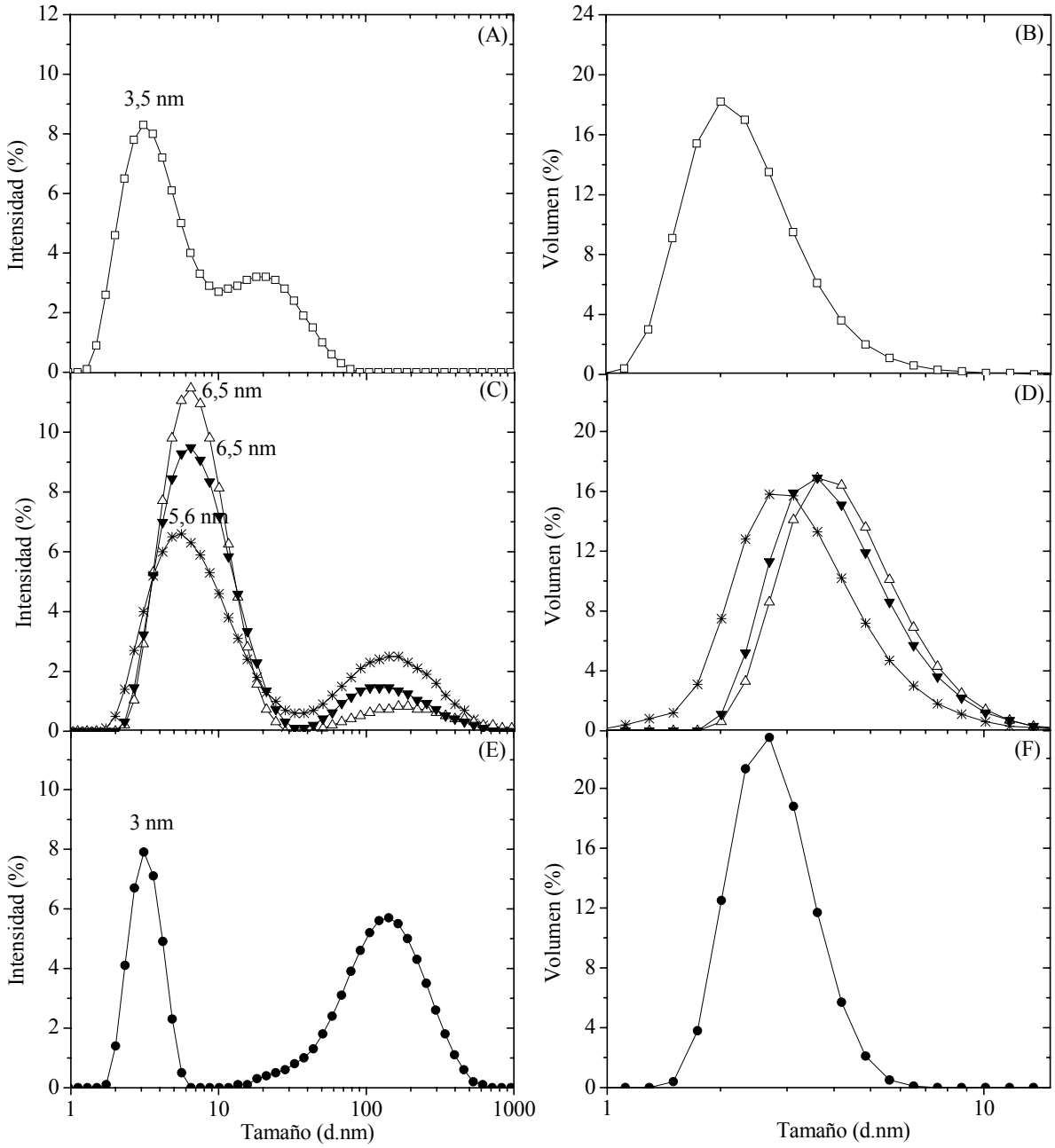


Figura I.1.33. Distribución de tamaño de partícula por intensidad (A, C y E) y volumen (B, D y F) de sistemas mixtos CMP:β–lg a pH 7: (A) (□) 0:100, (B) (△) 25:75, (▼) 50:50 y (✳) 75:25 y (C) (●) 100:0. Concentración total de proteína: 4 % p/p. Temperatura 25 °C.

Mediante el software del Malvern Zetasizer se estimaron los pesos moleculares correspondientes a 5,6 y 6,5 nm, resultando en 37,4 y 53,1 kDa, respectivamente.

Además del pico predominante de menor tamaño, los tres sistemas mixtos presentan un pico en tamaños mayores (con valores máximos de más de 100 nm), semejante al pico minoritario

mencionado en la solución de CMP sólo. La intensidad de este pico de tamaños mayores disminuyó con la disminución de CMP en los sistemas mixtos siendo despreciable su cantidad en los tres sistemas como se puede deducir de las distribuciones en volumen.

Dos fenómenos principales podrían explicar los resultados obtenidos en la medición de tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz: i) la formación de complejos de CMP:β–lg, o ii) la asociación de moléculas de CMP o β–lg entre sí, formando estructuras asociadas, debido a una limitada compatibilidad termodinámica entre CMP y β–lg a pH 7, condición en la cual ambos biopolímeros poseen una carga neta negativa. Esta compatibilidad limitada entre las moléculas de proteína incrementaría la "concentración efectiva", promoviendo así la asociación. Sin embargo, la "hipótesis segregativa" no es consistente con la desaparición de grandes oligómeros (valores máximos de *d(H)* mayor a 100 nm) de CMP observada en los sistemas mixtos (**Figura I.1.33**).

Así la primera opción, es decir, el complejamiento entre CMP y β–lg, pareciera ser la más probable, pero no se encontraron antecedentes en bibliografía sobre su complejamiento no covalente. *Veith & Reynolds (2004)* reportaron una complejo equimolar de 24 kDa, presente en varias muestras comerciales de muestras de WPC, pero estabilizado por uniones covalentes.

La forma glicosilada del CMP representa alrededor del 50 % del CMP total, siendo el ácido N–acetil–neuramínico (NANA) el carbohidrato predominante, conocido como ácido siálico. La muestra de CMP utilizada contiene un 8,5 % de ácido siálico en base seca *(Davisco Foods International)*. Los residuos glicosídicos pueden estar involucrados en interacciones intra e intermoleculares *(Minkiewicz, Dziuba & Muzinska, 1993)*.

Por otro lado, el CMP tiene carga negativa a pH neutro debido a la presencia de aminoácidos ácidos. Los grupos carboxílicos disociantes de NANA pueden otorgar carga negativa adicional. Es por eso que el CMP podría también interactuar electroestáticamente con zonas con cargas positivas de la β–lg (por ejemplo, residuos de lisina).

Haque, Casay, Wilson, Antila & Antila (1993) estudiaron el efecto de péptidos de caseína hidrolizados sobre las propiedades de asociación de proteínas lácteas por DLS y encontraron que los péptidos produjeron un aumento en el *d(H)* de β–lg en un valor más de diez veces mayor al de la proteína sola. Esta tendencia a la asociación de la β–lg en presencia de péptidos fue atribuida a dos posibles causas: i) una sutil alteración en la estructura como resultado de

un cambio en la energía libre debido a la unión proteína–proteína, ii) la formación de una estructura micelar mixta que puede ser capaz de disminuir la exposición de grupos hidrofóbicos al agua, lo cual es termodinámicamente favorable.

I.1.3.2. Transiciones térmicas de los sistemas mixtos CMP:β–lg a pH 7 estudiadas por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

En la **Tabla I.1.2** se muestran las transiciones térmicas observadas en los sistemas mixtos CMP:β–lg. Para la β–lg, los cambios entálpicos corresponden a la disociación del dímero y al proceso de desnaturalización (endotérmico), el cual se superpone con el proceso de agregación (exotérmico) durante el tiempo de medición en el DSC *(Baeza & Pilosof, 2002)*.

Tabla I.1.2. Parámetros térmicos para CMP, β–lg y sistemas mixtos CMP:β–lg a pH 7.

CMP:β–lg	T_o (°C) *	T_p (°C) *
0:100	66,46 ± 0,1	74,21 ± 0,2
25:75	60,53 ± 0,1	71,78 ± 0,1
50.50	63,58 ± 0,2	71,53 ± 0,1
75:25	62,58 ± 0,1	71,48 ± 0,1
100:0	–	–

*promedio ± desvío estándar de al menos dos repeticiones.

Varios autores sugirieron que la disociación del dímero es una etapa necesaria en el proceso de desnaturalización por calor *(Cairoli, Iametti & Bonomi, 1994; Iametti, De Gregori, Vecchio & Bonomi, 1996)* y esta reacción está favorecida durante el calentamiento a pH neutro *(Hoffmann & van Mil, 1999)*. Un aumento de la temperatura a pH 7 causa el desdoblamiento de los monómeros que involucra la ruptura de uniones no covalentes y expone grupos tiol e hidrofóbicos que estaban antes ocultos. El grupo tiol en el monómero modificado puede inducir reacciones exotérmicas de intercambio tiol/disulfuro conduciendo a la formación de agregados covalentes *(Hoffmann & van Mil, 1999; Relkin, 1996)*.

El CMP no mostró ninguna transición térmica debido a su estructura "random coil" y a la ausencia de uniones disulfuro (**Figura I.1.21**). *Ono, Yada, Yutani & Nakai (1987)* estudiaron

la conformación del CMP por dicroismo circular (CD) y sugirieron que tiene una estructura muy poco organizada.

Los termogramas de los sistemas mixtos CMP:β–lg revelaron por lo tanto las transiciones de β–lg con una disminución de la magnitud del cambio entálpico que se corresponde con las diferentes relaciones CMP:β–lg. Sin embargo, las temperaturas de transición de β–lg (**Tabla I.1.2**) disminuyeron en presencia de CMP. La disminución en la temperatura de desnaturalización en mezclas de proteínas ha sido atribuido a formación de complejos por interacciones electroestáticas *(Ivinova, Izumrudov, Muronetz, Galaev & Mattiasson, 2002)*. *Imeson, Ledward & Mitchell (1977)* mostraron que las interacciones electroestáticas perturban la estructura de mioglobina y albúmina de suero bovina causando una disminución en la estabilidad térmica. El sistema mixto CMP:β–lg con la menor relación (25:75) mostró la menor temperatura de inicio, indicando el alto grado de interacción o complejamiento en este sistema mixto. *Barbeau, Gauthier & Pouliot (1996)* estudiaron la estabilización térmica de β–lg en presencia de péptidos del suero fraccionados a partir de técnicas cromatográficas y sin fraccionar y encontraron que la desnaturalización térmica de β–lg es muy influenciada por el pH de la solución de proteína (disminuyendo la temperatura de desnaturalización al aumentar el pH desde 4,5 a 8) y por la presencia de fracciones de péptidos. Ellos sugirieron que los péptidos no fraccionados acentuaron el efecto del pH y la desnaturalización térmica de β–lg disminuyendo la temperatura en todo el rango de pH estudiado a través de un mecanismo similar al de la urea que se ha encontrado que disminuye también la estabilidad térmica de esta proteína *(Griko & Privalov, 1992)*. Por otro lado, los péptidos fraccionados por cromatografía presentaron un comportamiento diferente. El efecto protector de los péptidos hidrofóbicos probablemente resultó de su interacción con la parte hidrofóbica de β–lg, promoviendo una estructura más compacta de la molécula y la formación de uniones hidrógeno internos adicionales *(Barbeau et al., 1996)*. En nuestro caso, el CMP es un péptido con muy baja hidrofobicidad a pH neutro (como se verá más adelante) lo cual puede explicar la ausencia del efecto protector mencionado anteriormente sobre la estabilidad térmica de β–lg, sin embargo, esto no explicaría la desestabilización que provoca.

I.1.3.3. Electroforesis de sistemas mixtos a pH 7.

En la **Figura I.1.34** se observa la electroforesis en condiciones nativas de los sistemas mixtos CMP:β–lg. La línea correspondiente a la β–lg sola (0:100) presenta una banda mayoritaria con mayor movilidad que se puede atribuir a la β–lg.
La intensidad de esta banda en las calles correspondientes a los sistemas mixtos de la **Figura I.1.34** disminuye con la disminución de la concentración de β–lg en el sistema. Sin embargo, dicha disminución no es proporcional a la cantidad de β–lg en la mezcla.
Por otro lado, en la calle correspondiente a la solución de CMP solo (100:0) se observa una banda en la zona correspondiente a la β–lg, lo que se podría explicar por cierta contaminación de esta muestra con β–lg o a formas asociadas de CMP. Pero además se observa una banda con mayor movilidad que la β–lg. Esa banda de mayor movilidad se podría atribuir al CMP porque se observa en los sistemas mixtos con intensidad creciente a medida que aumenta la concentración de CMP en la mezcla. Sin embargo, esta banda de mayor movilidad es mucho menos intensa que las otras, lo que se puede explicar por el hecho de que el CMP no se tiñe bien con Commassie Blue (CB) como fue explicado en la **Figura I.1.17**.
En los sistemas mixtos no se observaron bandas adicionales que indicaran la presencia de complejos, por lo tanto, lo único que podría indicar la presencia de complejos es esa disminución no proporcional de la banda más intensa.
Si bien, durante este estudio por electroforesis PAGE en condiciones nativas no se mostraron evidencias de complejamiento, estos resultados no contradicen los resultados previos obtenidos por mediciones de tamaño promedio y distribución de tamaño de partícula y DSC. Si existiera formación de complejos, posiblemente, estos serían muy débiles y se disociarían en la dilución y las condiciones de la corrida electroforética.

En resumen, los resultados a temperatura ambiente derivados de la medición del tamaño de partícula (**Figuras I.1.33**), DSC (**Tabla I.1.2**) son consistentes con la formación de complejos CMP:β–lg en la fase acuosa mediados por interacciones electroestáticas y/o por uniones puente hidrógeno entre CMP y β–lg.

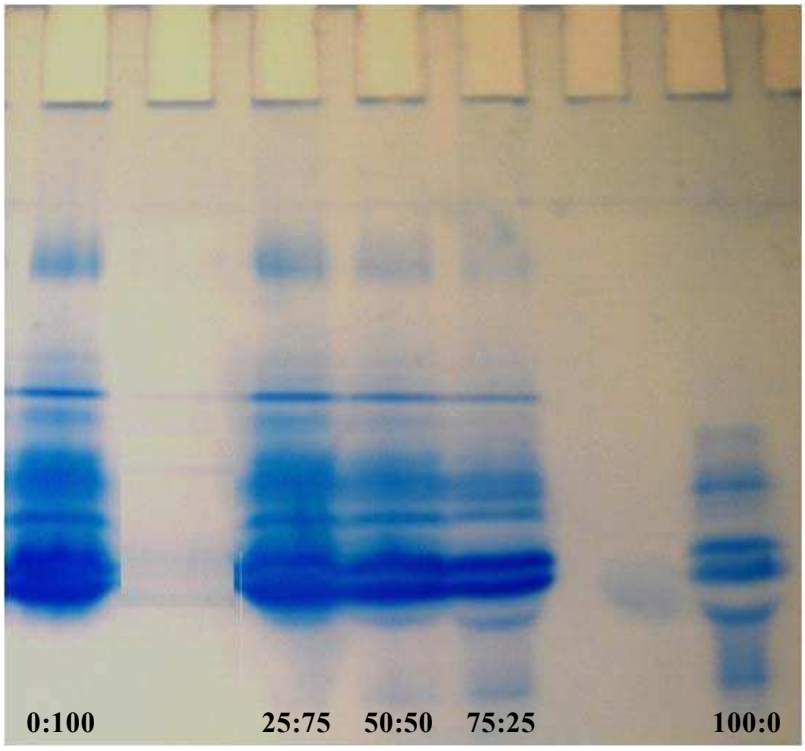


Figura I.1.34. Patrones PAGE en condiciones nativas de sistemas con una relación CMP:β–lg.

I.1.3.4. Efecto del tratamiento térmico en sistemas mixtos CMP:β–lg a pH 7.

En la **Figura I.1.35** se observa la distribución de tamaño de partícula por intensidad y volumen de los cinco sistemas discutidos anteriormente luego del tratamiento térmico hasta 85 °C.

Si comparamos estas distribuciones con las correspondientes a temperatura ambiente (**Figuras I.1.33**) se observa un cambio muy marcado, excepto en la del CMP, el cual no es afectado por el tratamiento térmico a pH 7 (**Figura I.1.33E** y **F y Figura I.1.35E** y **F**) *(Brody, 2000; Moreno et al., 2002)* como fue discutido anteriormente en el apartado **I.1.2**.

El comportamiento de la solución de β–lg bajo tratamiento térmico fue explicado ampliamente en las **Figuras I.1.4**, **I.1.6**, **I.1.7** y **I.1.8**.

En este caso (**Figura I.1.35**), debido a que la concentración es más baja (4 %), parte de la proteína permanece en la población de menor tamaño aunque la intensidad con respecto a la distribución antes del tratamiento térmico (**Figura I.1.33**) es prácticamente nula. Así, tanto en intensidad como en volumen el pico principal es el correspondiente al de los agregados formados.

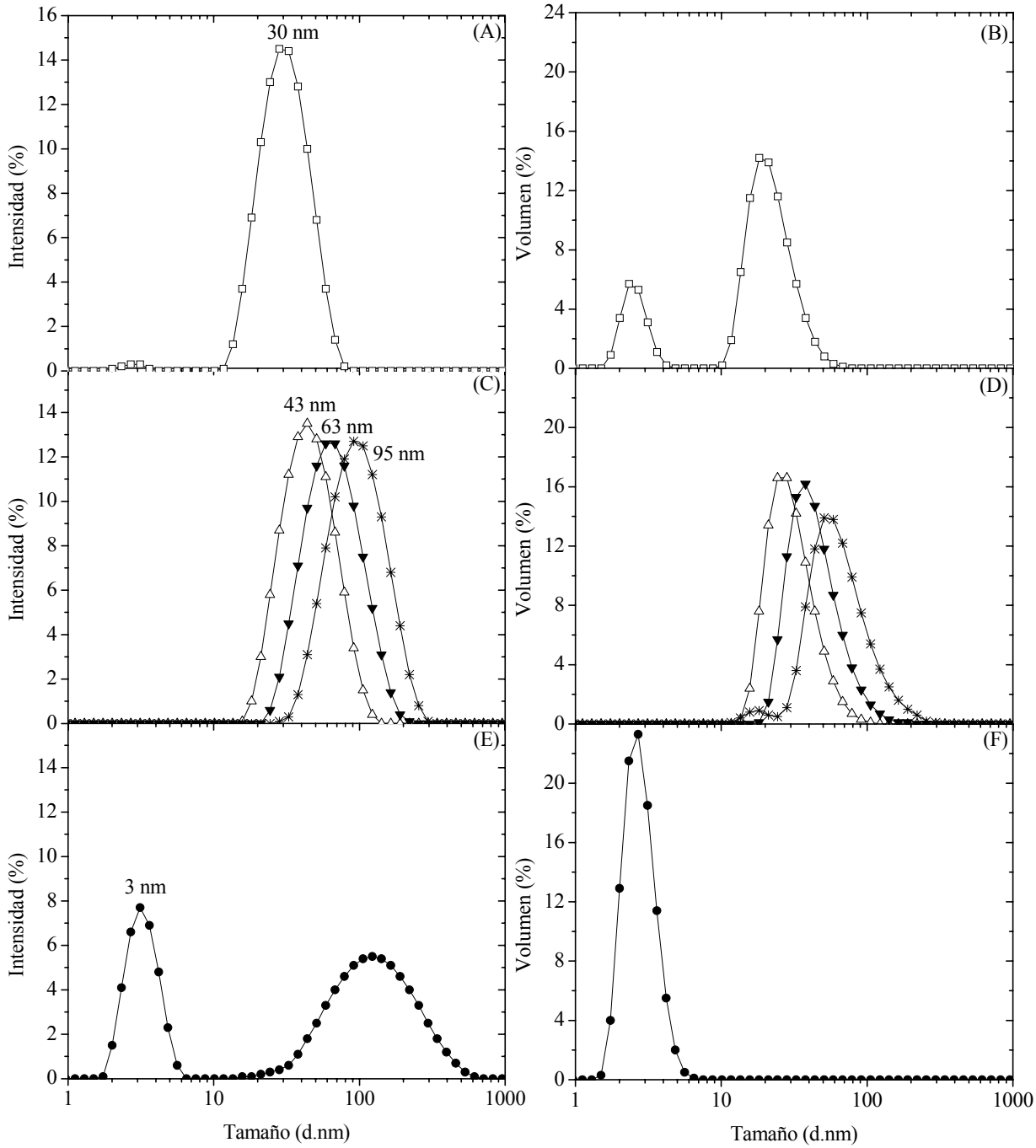


Figura I.1.35. Distribución de tamaño de partícula por intensidad (A, C y E) y volumen (B, D y F) de sistemas mixtos CMP:β–lg luego del tratamiento térmico hasta 85 °C a pH 7: (A) (□) 0:100, (B) (△) 25:75, (▼) 50:50 y (✳) 75:25 y (C) (●) 100:0. Concentración total de proteína: 4 % p/p. Temperatura 25 °C.

En las distribuciones de los sistemas mixtos desapareció por completo la población de diámetros más pequeños y sólo se observó la presencia de poblaciones en tamaños más grandes, indicando la agregación de estos sistemas por efecto de la temperatura. El valor

máximo del pico aumentó con el aumento de la concentración de CMP en los sistemas mixtos, desde 43 hasta 95 nm.

Por lo tanto, el hecho de que los sistemas mixtos se vean afectados por la temperatura se debe, sin duda, a la presencia de β–lg en los sistemas. A pesar de esto, si fuese sólo la β–lg la que se agrega en esta mezcla, se esperaría que el sistema con mayor contenido de β–lg fuese el que diera los mayores tamaños entre los tres sistemas mixtos, sin embargo esto no fue así, presentando mayor tamaño el que tiene mayor concentración de CMP en las mezcla. Este comportamiento se relacionaría con la formación de complejos entre CMP y β–lg a pH 7. También se podría pensar que el pico del CMP presente en tamaños grandes (con valores máximos de *d(H)* mayores a 100 nm) podría influenciar el comportamiento antes mencionado, pero eso se descarta cuando se observa la distribución en volumen, donde el CMP se observa como antes del calentamiento con un único pico en los tamaños pequeños, indicando que la población de tamaño mayor es claramente despreciable.

Por el contrario, al observar la distribución en volumen de los sistemas mixtos, la población de formas agregadas es la mayoritaria. Esto confirmaría la formación de complejos mencionada anteriormente, pero además sugeriría que ese complejo CMP:β–lg se agrega con la temperatura, del mismo modo que la solución de β–lg sola.

Además, el hecho de que en la distribución en volumen de los sistemas mixtos no se observe ningún pico en el rango de los monómeros de CMP y/o β–lg indicaría que ambas proteínas presentes participaron en la formación de los complejos.

El análisis de estos resultados por el método de Cumulantes permite obtener el diámetro hidrodinámico promedio de los sistemas, el cual se muestra en la **Figura I.1.36** en función de la temperatura de calentamiento.

En el CMP sólo se observa un leve aumento en el *d(H)* promedio durante el calentamiento, sin embargo, en el posterior enfriamiento esto se revierte obteniendo un valor semejante al inicial, antes del tratamiento térmico, como se mostró en la **Figura I.1.35**.

La solución de β–lg aumenta el *d(H)* promedio con el aumento de temperatura a partir de la temperatura de desnaturalización (T_d ~ 66 °C) como fue detallado ampliamente en la **Figura I.1.8**, y se obtuvo un valor final esperado, intermedio entre los obtenidos por las soluciones de β–lg al 3 y al 6 % p/p presentadas en dicha figura.

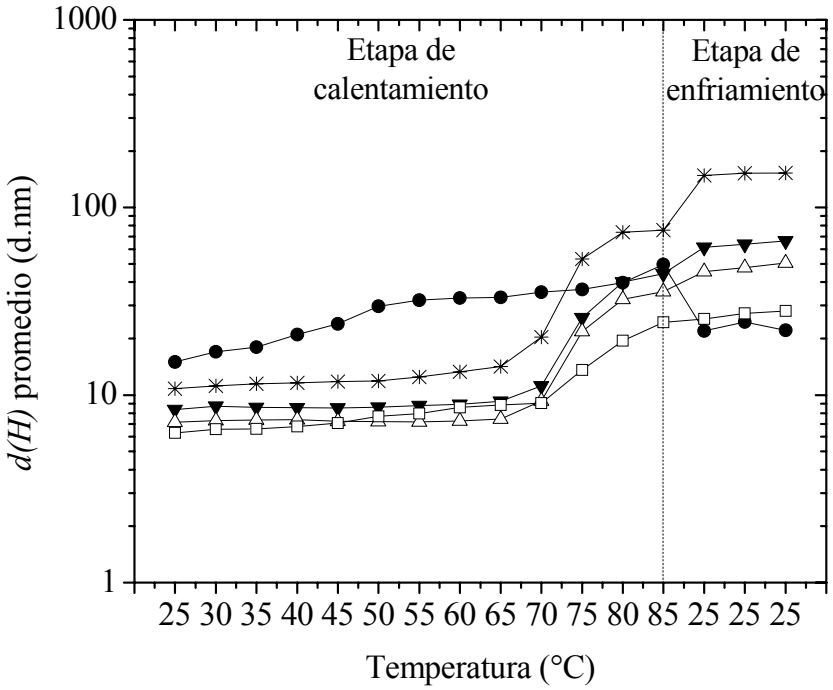


Figura I.1.36. Cambio del *d(H)* promedio durante el calentamiento y el posterior enfriamiento de sistemas mixtos CMP:β–lg a pH 7 en relación: (□) 0:100, (△) 25:75, (▼) 50:50, (✳) 75:25 y (●) 100:0. Concentración total de proteína: 4 % p/p.

Por su parte, las soluciones de los sistemas mixtos también aumentaron su *d(H)* promedio con el aumento de la temperatura, siendo mayor el valor a mayor concentración de CMP, del mismo modo que fue observado en la **Figura I.1.35**. En este caso como los sistemas mixtos mostraron un comportamiento monomodal, el valor de *d(H)* promedio refleja en buena medida el comportamiento observado en las distribuciones.

Para confirmar la formación de agregados se realizó una corrida electroforética en condiciones nativas después del tratamiento térmico (**Figura I.1.37**) para comparar con la corrida realizada con las muestras antes del tratamiento térmico (**Figura I.1.34**).

Al comparar ambas figuras se observa en la calle correspondiente a la β–lg sola (0:100) una notable disminución de la intensidad de la banda atribuida a la β–lg y la aparición de nuevas bandas con menor movilidad, lo que evidenciaría la formación de agregados pequeños. También se observa que parte de la muestra no pudo entrar al gel lo que se puede explicar por la presencia de los agregados más grandes observados para este sistema por DLS (*d(H)* entre 10 y 70 nm, **Figura I.1.35**).

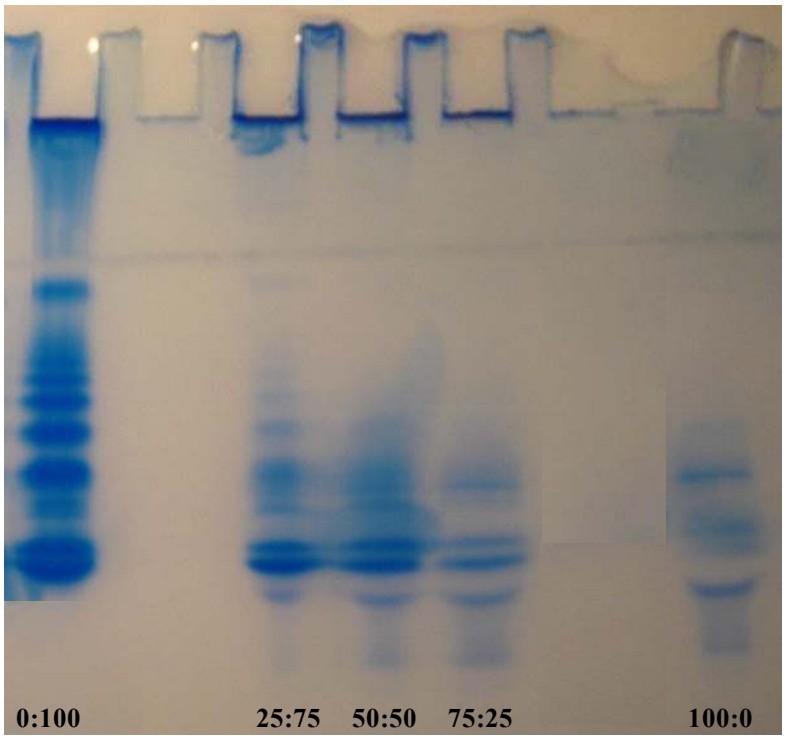


Figura I.1.37. Electroforesis PAGE en condiciones nativas de sistemas mixtos CMP:β–lg a pH 7, después del tratamiento térmico hasta 85 °C.

En la calle correspondiente al CMP solo, no se esperarían encontrar cambios por los resultados obtenidos por DLS, sin embargo, se observa una disminución en la intensidad de la banda contaminante de β–lg y también de la banda atribuida al CMP (la de mayor movilidad). A pesar de ello, no se observaron bandas nuevas con respecto a la electroforesis antes del tratamiento térmico que evidenciaran la formación de agregados. Esto se debería a que los agregados formados serían despreciables (**Figura I.1.35**).

Este resultado debe interpretarse con cautela debido a las siguientes consideraciones: (i) el CMP no se tiñe adecuadamente con CB, con lo cual se magnifica la presencia de β–lg contaminante, (ii) la β–lg contaminante estaría en proporción sumamente baja (ver electroforesis CMP en el apartado anterior), (iii) la β–lg se puede complejar con CMP y sufrir agregación térmica.

Al analizar los sistemas mixtos encontramos también una gran disminución en la banda correspondiente a la β–lg y al CMP lo que sugeriría la agregación de los mismos formando agregados muy grandes, que no pudieron entrar al gel concentrador. Estos resultados coinciden con los observados por DLS que indican que los agregados tienen valores de *d(H)* entre 20 y 300 nm, tamaños que corresponden a pesos moleculares mayores a 200 kDa.

Estos resultados muestran que si bien el CMP no se agrega por el tratamiento térmico, su presencia promueve la formación de agregados aún más grandes que los obtenidos para β–lg sola. Este sería un comportamiento altamente sinérgico.

I.1.3.5. Tamaño promedio y distribución de tamaño de partícula a temperatura ambiente en soluciones mixtas a pH 3,5.

Se estudió la distribución de tamaño de partícula de los mismos sistemas a pH 3,5 (**Figura I.1.38**). Es posible observar que las distribuciones son muy diferentes a las observadas a pH 7 (**Figura I.1.33**).

La distribución de la β–lg sola (sistema 0:100) (**Figura I.1.38A**), mostró un pico mayoritario en intensidad que se corresponde con la forma dimérica de la proteína como se vió en la **Figura I.1.10** del apartado **I.1.1**. Presenta además, dos pequeños picos en tamaños mayores que son despreciables en cantidad como se muestra en la distribución por volumen (**Figura I.1.38B**).

Con respecto a la solución de CMP solo (**Figura I.1.38E**), esta distribución presenta un pico mayoritario en intensidad con un valor máximo de 6 nm de diámetro, como fue explicado también previamente (**Figura I.1.18** del apartado **I.1.2**). También en esta solución aparece un pico en tamaños mayores que es despreciable en volumen (**Figura I.1.38F**).

Las pequeñas diferencias observadas en los picos más grandes de las soluciones de β–lg y CMP solos respecto a la explicada en secciones previas pueden atribuirse a la diferente concentración utilizada en este estudio. De todos modos, cabe resaltar, que las poblaciones de diámetros más grandes no son las que se analizarán en detalle ya que como se dijo para cada solución, son las menos numerosas (**Figura I.1.38B** y**F**).

Los sistemas mixtos (25:75, 50:50 y 75:25) presentaron distribuciones de intensidad multimodales en las tres relaciones estudiadas (**Figura I.1.38C**). Los sistemas mixtos con mayor proporción de CMP (50:50 y 75:25) presentaron valores máximos de pico de alrededor de 7 nm, valor mayor a los encontrados para los biopolímeros solos. La estimación del peso molecular mediante el software de Malvern Zetasizer da un valor aproximado de 65 kDa, lo que indicaría la formación de complejos.

Los sistemas mixtos presentaron además formas agregadas que fueron minoritarias, al igual que para los componentes solos, debido a que en las distribuciones por volumen no se observan (**Figura I.1.38D**).

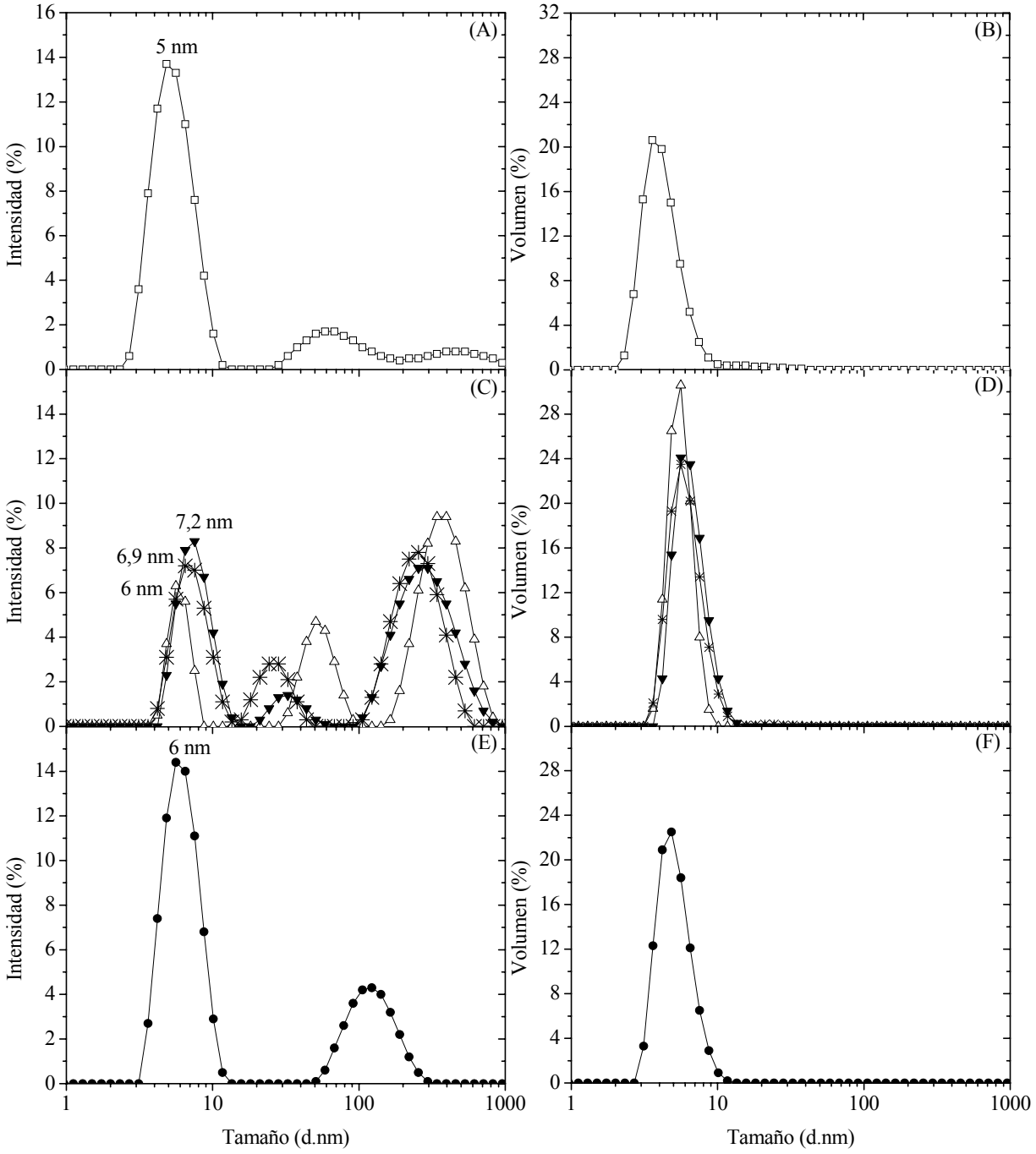


Figura I.1.38. Distribución de tamaño de partícula por intensidad (A, C y E) y volumen (B, D y F) de sistemas mixtos CMP:β–lg a pH 3.5: (A) (□) 0:100, (B) (△) 25:75, (▼) 50:50 y (✳) 75:25 y (C) (●) 100:0. Concentración total de proteína: 4 % p/p. Temperatura 25 °C.

A pH 3,5 la β–lg se encuentra debajo de su pI (4,8 – 5,2) y por lo tanto presenta una carga neta positiva. En cuanto al CMP, sólo las fracciones no glicosiladas (aCMP) están protonadas y con carga neta positiva, mientras que las fracciones glicosiladas (gCMP) se encuentran cargadas negativamente (**Figura I.1.24**). Por lo tanto, a pH 3,5, sería factible la formación de complejos electrostáticos fuertes entre β–lg y gCMP.

I.1.3.6. Transiciones térmicas de los sistemas mixtos CMP:β–lg a pH 3,5.

La posible interacción entre CMP y β–lg se estudió por DSC. En la **Tabla I.1.3** se muestran las transiciones térmicas observadas en los sistemas mixtos CMP:β–lg a pH 3,5.

Tabla I.1.3. Parámetros térmicos para CMP, β–lg y sistemas mixtos CMP:β–lg a pH 3,5.

CMP:β–lg	T_o (°C) *	T_p (°C) *
0:100	79,37 ± 0,2	84,10 ± 0,1
25:75	78,31 ± 0,1	83,69 ± 0,1
50.50	77,11 ± 0,1	82,33 ± 0,2
75:25	74,94 ± 0,2	82,43 ± 0,1
100:0	–	–

*promedio ± desvío estándar de al menos dos repeticiones.

Al comparar estos datos con los obtenidos a pH 7 (**Tabla I.1.2**) observamos que la T_o y T_p fueron mucho más altas a pH 3,5 que a pH 7, lo que está de acuerdo con estudios previos *(Relkin et al., 1998)*. La β–lg tiene una temperatura máxima de desnaturalización a pH 3 – 4 *(Mulvihill & Donovan, 1987; Relkin, 1996; Verheul et al., 1998)*.

Al igual que para pH 7, los cambios entálpicos que se observan en los sistemas mixtos corresponden a la desnaturalización de β–lg, ya que CMP no presenta ninguna transición térmica. *Wang (2007)* observó un pico exotérmico correspondiente a la agregación de CMP al 5 % p/p a pH 3,5 por medio de un microcalorímetro, pero no observó ningún pico endotérmico.

Las temperaturas de transición de β–lg disminuyeron con el aumento de la concentración de CMP en los sistemas mixtos. La disminución de la temperatura de desnaturalización se puede atribuir nuevamente a la formación de complejos mediante interacciones electrostáticas *(Ivinova et al., 2002)*. *Van de Weert, Benedix Anderson & Frokjaer (2004)* determinaron

mediante DSC que la estabilidad de la lisozima se redujo 16 °C debido a la formación de complejos con heparina.

La máxima disminución de la T_o de β–lg a pH 3,5 fue observada para el sistema CMP:β–lg con la relación 75:25 y la reducción fue de 4,5 °C, mientras que como vimos para pH 7 el sistema que redujo más la T_o (reducción de 6 °C) fue el 25:75.

I.1.3.7. Efecto del tratamiento térmico en sistemas mixtos CMP:β–lg a pH 3,5.

En la **Figura I.1.39** se muestran las distribuciones obtenidas para los cinco sistemas luego del tratamiento térmico hasta 85 °C.

La distribución por intensidad para la solución de β–lg sola (**Figura I.1.39A**) muestra un comportamiento bimodal con la población correspondiente a la forma dimérica de la proteína (estado predominante de β–lg a este pH) y otra de mayor intensidad con un valor máximo de pico de alrededor de 30 nm de diámetro. Este resultado, si se compara con los obtenidos antes del tratamiento térmico, sugeriría la formación de agregados. Sin embargo, cuando se analiza la distribución por volumen (**Figura I.1.39B**) se observa que esa población de tamaños mayores a 10 nm es despreciable en cantidad (como fue observado en la **Figura I.1.16** del apartado **I.1.1**).

Al analizar la distribución de CMP luego del tratamiento térmico, encontramos tanto en intensidad (**Figura I.1.39E**) como en volumen (**Figura I.1.39F**) la desaparición del pico correspondiente a la población de tamaño más pequeño y la aparición de formas muy agregadas que llegan al límite de detección del equipo. Este comportamiento era el esperado ya que, como fue visto en el apartado **I.1.2**, CMP se asocia en el tiempo por el sólo efecto del pH (3,5). Por lo tanto, un factor adicional, como es la temperatura acelera aún más el proceso de agregación, comportamiento que fue observado en las **Figuras I.1.27, 28** y **29** del apartado **I.1.2**. Además, al analizar la distribución a 25 °C luego del tratamiento térmico se verifica que tal agregación no es reversible, como sí lo es en el caso de la agregación térmica del CMP a pH 7. El tratamiento térmico inducido a la solución de CMP fue más corto que para el resto de los sistemas debido a que, por encima de 70 °C, los resultados presentaban numerosos errores,

razón por la cual se decidió cortar el calentamiento y bajar la temperatura a 25 °C para realizar la medición post–tratamiento térmico que es la que se presenta en la **Figura I.1.39**.

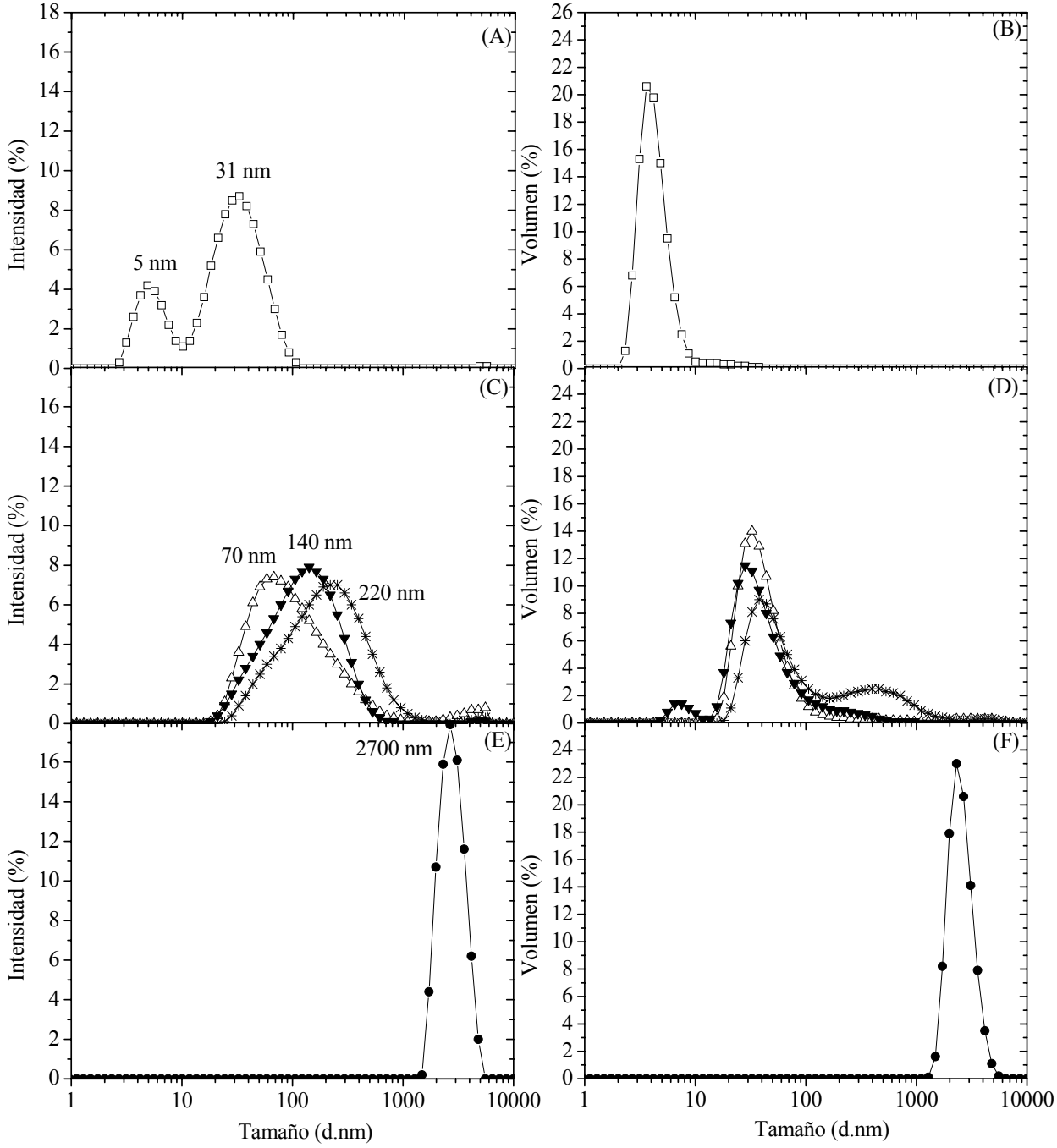


Figura I.1.39. Distribución de tamaño de partícula por intensidad (A, C y E) y volumen (B, D y F) de sistemas mixtos CMP:β–lg luego del tratamiento térmico hasta 85 °C (y 70 °C en el caso del CMP solo) a pH 3,5: (A) (□) 0:100, (B) (△) 25:75, (▼) 50:50 y (✳) 75:25 y (C) (●) 100:0. Concentración total de proteína: 4 % p/p. Temperatura 25 °C.

Los sistemas mixtos mostraron distribuciones de intensidad (**Figura I.1.39C**) prácticamente monomodales con valores máximos de picos de alrededor de 70, 140 y 220 nm para los sistemas mixtos CMP:β–lg 25:75, 50:50 y 75:25, respectivamente. Aunque en la distribución en volumen las diferencias entre los tres sistemas mixtos fueron más sutiles (**Figura I.1.39D**). Es importante resaltar que en ninguno de los tres sistemas mixtos se observó presencia de β–lg dimérica (como se observó en la distribución del sistema 0:100) ni tampoco agregados en los tamaños encontrados para la solución de CMP solo (100:0). Este hecho apoyaría una vez más la hipótesis de la formación de complejos CMP:β–lg que se comportarían de una manera intermedia a los componentes por separado.

En la **Figura I.1.40** se presentan los resultados obtenidos a partir del análisis de Cumulantes. El sistema de β–lg sola presentó un aumento leve pero gradual del *d(H)* promedio con el incremento de la temperatura. Durante el posterior enfriamiento este valor se mantuvo prácticamente constante.

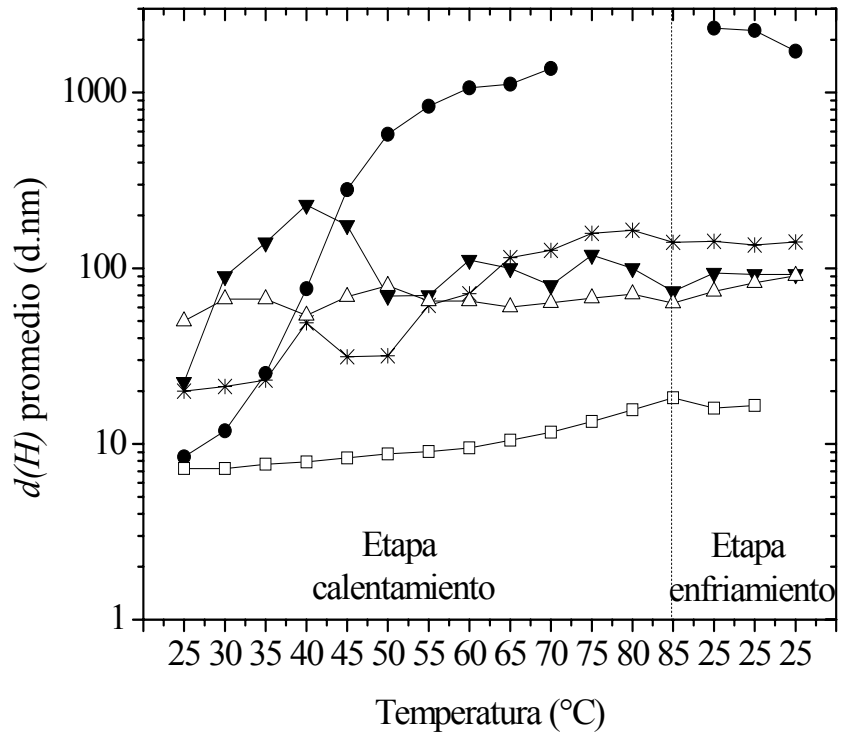


Figura I.1.40. Cambio del *d(H)* promedio durante el calentamiento y el posterior enfriamiento de sistemas mixtos CMP:β–lg a pH 3,5 en relación: (□) 0:100, (△) 25:75, (▼) 50:50, (✳) 75:25 y (●) 100:0. Concentración total de proteína: 4 % p/p.

Por otro lado, el CMP solo mostró un aumento mucho más importante que la β–lg en el *d(H)* promedio. El calentamiento fue cortado antes de llegar a los 85 °C como se mencionó anteriormente porque los resultados superaban el límite de detección del equipo lo que generaba numerosos errores. Luego del enfriamiento los agregados no revirtieron, a diferencia de lo observado a pH 7, y mantuvieron un *d(H)* promedio relativamente constante.
Los sistemas mixtos, en cambio, mostraron cambios menos notables. Sin embargo, el *d(H)* promedio de los tres sistemas mixtos también aumentó con el tratamiento térmico respecto al valor inicial. En esta figura se puede observar también que el *d(H)* inicial (25 °C antes del tratamiento térmico) de los tres sistemas mixtos fue superior al de los componentes individuales, debido a la formación de complejos o agregados a temperatura ambiente mencionada anteriormente.

En la **Figura I.1.41** se resume comparativamente el *d(H)* de los sistemas estudiados, luego del tratamiento térmico hasta 85 °C a pH 7 y pH 3,5 con el fin de comparar los *d(H)* promedio obtenidos para cada condición de pH.

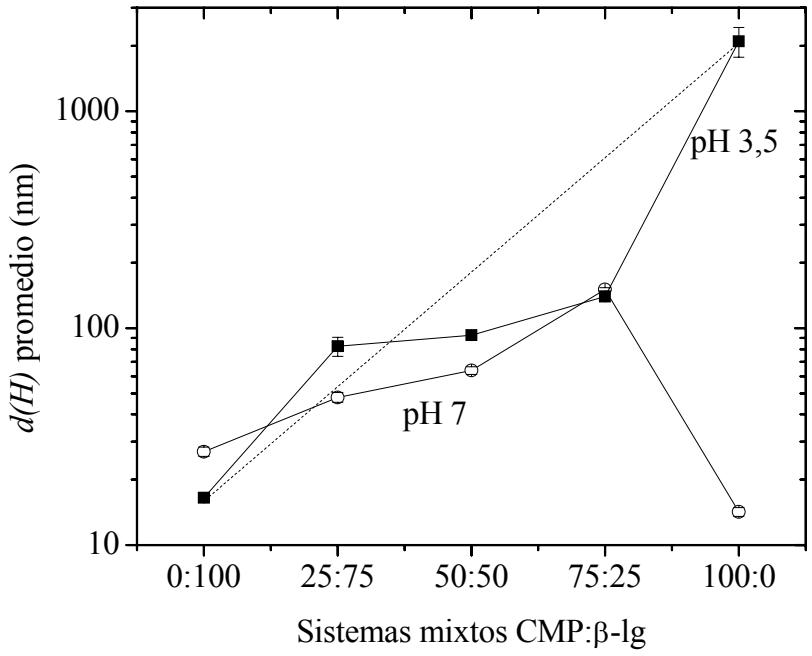


Figura I.1.41. *d(H)* promedio (a 25 °C) luego del tratamiento térmico hasta 85 °C de los sistemas mixtos CMP:β–lg a pH: (○) 7 y (■) 3,5. Se indica con línea de puntos los resultados esperables para los sistemas a pH 3,5 si no existiera interacción.

Es importante recordar que el *d(H)* promedio está determinado por todas las poblaciones observadas en la distribución por intensidad, con lo cual puede verse magnificado cuando se observan poblaciones de tamaños grandes aunque estas luego sean despreciables en volumen. Por eso este gráfico sólo sirve con fines comparativos y no para detenerse en los valores individuales.

Cabe destacar que a pH 3,5 se obtuvieron *d(H)* promedio mayores que a pH 7 en casi todos los casos, salvo en el sistema 0:100 (β–lg sola). El mismo comportamiento fue observado también a una concentración más elevada en el apartado **I.1.1** (**Figura I.1.14**).

Además, en esta figura es muy notable la diferencia entre el *d(H)* promedio de la solución de CMP solo, luego del tratamiento térmico a pH 3,5 (con un *d(H)* promedio de más de 2000 nm) respecto a la solución a pH 7 que presenta un valor muy similar al observado antes del tratamiento térmico.

Se puede concluir que en los sistemas mixtos a pH 7, existe un comportamiento sinérgico en la formación de agregados ya que la presencia de cantidades crecientes de CMP promueve la formación de agregados cada vez más grandes, aún cuando el potencial de agregación de CMP es ínfimo.

A pH 3,5, donde ambos componentes pueden agregarse (el CMP mucho más que la β–lg), se observa un comportamiento antagónico en las mezclas 50:50 y 75:25 ya que los agregados formados presentan tamaños menores que los esperables si no existiera interacción (línea de puntos en **Figura I.1.41**).

I.1.4. Referencias.

Apenten, R. K. O., & Galani, D. (1999). Is the rate of sulfur-disulfide Exchange between the native β-lactoglobulin and PDS related to protein conformational stability? *International Journal of Food Science and Technology*, *34*, 483-486.

Apenten, R. K. O., Khokhar, S., & Galani, D. (2002). Stability parameters for β-lactoglobulin thermal dissociation and unfolding in phosphate buffer at pH 7.0. *Food Hydrocolloids*, *16*, 95-103.

Aymard, P., Durand, D., & Nicolai, T. (1996). The effect of temperature and ionic strength on the dimerisation of β-lactoglobulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, *19*, 213-221.

Baeza, R. I., Gugliotta, L. M., & Pilosof, A. M. R. (2001). Heat induced aggregation of β-lactoglobulin in the presence of non gelling polysaccharides studied by dynamic light scattering. *Proceedings of EMPROMER 2001*, *3*, 1513-1518.

Baeza, R. I., Gugliotta, L. M., & Pilosof, A. M. R. (2003). Gelation of β-lactoglobulin in the presence of propylene glycol alginate: kinetics and gel properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *31*, 81-93.

Baeza, R. I., & Pilosof, A. M. R. (2002). Calorimetric studies of thermal denaturation of β-lactoglobulin in the presence of polysaccharides. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, *35*, 393-399.

Barbeau, J., Gauthier, S. F., & Pouliot, Y. (1996). Thermal stabilization ofl β-lactoglobulin by whey peptide fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*, 3939-3945.

Baussay, K., Le Bon, C., Nicolai, T., Durand, D., & Busne, J. P. (2004). Influence of the ionic strength on the heat-induced aggregation of the globular protein of β-lactoglobulin at pH 7. *International Journal of Biological Macromolecules*, *34*, 21-28.

Beaulieu, M., Corredig, M., Turgeon, S. L., Wicker, L., & Doublier, J.-L. (2005). The formation of heat-induced protein aggregates in whey protein/pectin mixtures studied by size exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering detection. *Food Hydrocolloids*, *19*, 803-812.

Brody, E. P. (2000). Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition*, *84*(1), S39-S46.

Bromley, E. H. C., Krebs, M. R. H., & Donald, A. M. (2005). Aggregation across the length-scales in β-lactoglobulin. *Faraday Discussions*, *128*, 13-27.

Bryant, C. M., & McClements, D. J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trend in Food Science and Technology*, *9*, 143-151.

Cairoli, S., Iametti, S., & Bonomi, F. (1994). Reversible and irreversible modifications of β-lactoglobulin upon exposure to heat. *Journal of Protein Chemistry*, *13*, 347-354.

Creamer, L. K., Bienvenue, A., Nilsson, H., Paulsson, M., van Wanroij, M., Lowe, E. K., Anema, S. G., Boland, M. J., & Jiménez-Flores, R. (2004). Heat-induced redistribution of disulfide bonds in milk proteins. 1. Bovine β-lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 7660-7668.

Das, K. P., & Kinsella, J. E. (1989). pH dependent emulsifying properties of β-lactoglobulin *Journal of Dispersion Science and Technology*, *10*(1), 77-102.

Davisco Foods International En: www.daviscofoods.com.

de Wit, J. N. (2009). Thermal behaviour of β-lactoglobulin at temperatures up to 150 °C. A review. *Trends in Foods Science & Technology*, *20*(1), 27-34.

de Wit, J. N., & Klarenbeek, G. (1981). A differential scanning calorimetric study of the thermal behaviour of bovine β-lactoglobulin at temperatures up to 160 °C. *Journal of Dairy Research*, *48*, 293-302.

Donovan, M., & Mulvihill, D. M. (1987). Thermal denaturation and aggregation of whey proteins. *Irish Journal of Food Science and Technology*, *11*, 87-100.

Etzel, M. R. (1999). Production of κ-casein macropeptide for nutraceutical uses. vol. 5,968,586. United States.

Galani, D., & Apenten, R. K. O. (1999). Heat-induced denaturation and aggregation of β-lactoglobulin: kinetics of formation of hydrophobic and disulphide-lined aggregates. *International Journal of Food Sciencie and Technology*, *34*, 467-476.

Gimel, J. C., Durand, D., & Nicolai, T. (1994). Structure and distribution of aggregates formed after heat-induced denaturation of globular proteins. *Macromolecules*, *27*, 583-589.

Gottschalk, M., Nilsson, H., Roos, H., & Halle, B. (2003). Protein self-association in solution: The bovine β-lactoglobulin dimer and octamer. *Protein Science*, *12*, 2404-2411.

Griffin, W. G., & Griffin, M. C. A. (1993). Time-dependent polydispersity of growing colloidal aggregates: predictions from dynamic light scattering. *Journal of Chemical Society, Faraday Trans.*, *89*, 2879-2889.

Griko, I. V., & Privalov, P. L. (1992). Calorimetric study of the thermal denaturation of β-lactoglobulin in the presence of urea and phosphate ions. *Molekuliarnaia Biologiia (Moskva)*, *26*(1), 150-157.

Haque, Z. U., Casay, G. A., Wilson, W. W., Antila, P., & Antila, V. (1993). Effect of casein hydrolyzates on association properties of milk proteins as seen by dynamic light scattering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *41*(2), 203-207.

Haque, Z. U., & Sharma, M. (1997). Thermal gelation of β-lactoglobulin AB purified from cheddar whey. 1. Effect of pH on association as observed by dynamic light scattering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 2958-2963.

Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., & McCelments, D. J. (2006). Characterization of β-lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, *20*, 577-585.

Hoffmann, M. A. M., Roefs, S. P. F. M., Verheul, M., van Mil, P. J. J. M., & de Kruif, K. G. (1996). Aggregation of β-lactoglobulin studied by in situ light scattering. *Journal of Dairy Research*, *63*, 423-440.

Hoffmann, M. A. M., Sala, G., Olieman, C., & de Kruif, K. G. (1997). Molecular mass distributions of heat-induced β-lactoglobulin aggregates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 2949-2957.

Hoffmann, M. A. M., & van Mil, P. J. J. M. (1997). Heat-induced aggregation of β-lactoglobulin: role of the free thiol group and disulfide bonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 2942-2948.

Hoffmann, M. A. M., & van Mil, P. J. J. M. (1999). Heat induced aggregation of β-lactoglobulin as a function of pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 1898-1905.

Holland, J. W., Deeth, H. C., & Alewood, P. F. (2006). Resolution and characterization of multiple isoforms of bovine kappa-casein by 2-DE following a reversible cysteine-tagging enrichment strategy. *Proteomics*, *6*(10), 3087-3095.

Iametti, S., De Gregori, B., Vecchio, G., & Bonomi, F. (1996). Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of β-lactoglobulin. *European Journal Biochemistry*, *237*, 106-112.

Imeson, A. P., Ledward, D. A., & Mitchell, J. R. (1977). On the nature of the interactions between some anionic polysaccharides and proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *28*, 661-668.

Ivinova, O. N., Izumrudov, V. A., Muronetz, V. I., Galaev, I. Y., & Mattiasson, B. (2002). Influence of complexing polyanions on the thermostability of basic proteins. *Macromolecular Bioscience*, *3*, 210-215.

Ju, Z. Y., & Kilara, A. (1998). Effects of preheating on properties of aggregates and of cold-set gels of whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 3604-3608.

Kreuβ, M., Krause, I., & Kulozik, U. (2008). Separation of a glycosylated and non-glycosylated fraction of caseinomacropeptide using different anion-exchange stationary phases. *Journal of Chromatography A*, *1208*, 126-132.

Kreuβ, M., Strixner, T., & Kulozik, U. (2009). The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropeptide. *Food Hydrocolloids*, *23*(7), 1818-1826.

Le Bon, C., Nicolai, T., & Durand, D. (1999). Growth and structure of aggregates of heat-denatured β-lactoglobulin *International Journal of Food Science and Technology*, *34*, 451-465.

Lefevre, T., & Subirade, M. (1999). Structural and interaction properties of β-lactoglobulin as studied by FTIR spectroscopy. *International Journal of Food Science and Technology*, *34*, 419-428.

Lieske, B., Konrad, G., & Kleinschmidt, T. H. (2004). Isolation of caseinomacropeptide from rennet whey by a multi-stage ultrafiltration process. II. Influence of pH and heating on the carbohydrate moiety of glycomacropeptide. *Milchwissenschaft*, *59*, 291-294.

Manderson, G. A., Hardman, M. J., & Creamer, L. K. (1998). Effect of heat treatment on the conformation and aggregation of β-lactoglobulin A, B and C. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *46*, 5052-5061.

Manderson, G. A., Hardman, M. J., & Creamer, L. K. (1999). Effect of heat treatment on bovine β-lactoglobulin A, B, and C explored using thiol availability and fluorescence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 3617-3627.

Mc Kenzie, H. A. (1971). β-lactoglobulins. En: H. A. Mc Kenzie, *Milk proteins. Chemistry and Molecular Biology*, vol. 2 (pp. 257-330). New York: Academic Press.

Mc Kenzie, H. A., & Sawyer, W. H. (1967). Effect of pH on β-lactoglobulin. *Nature*, *214*, 1101-1104.

Mc Swiney, M., Singh, H., & Campanella, O. H. (1994). Thermal aggregation and gelation of bovine b-lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, *8*, 441-453.

Mehalebi, S., Nicolai, T., & Durand, D. (2008). Light scattering study of heat-denatured globular protein aggregates. *International Journal of Biological Macromolecules*, *43*, 129-135.

Mikkelsen, T., FrØkicœr, C., Topp, C., Bonomi, F., Iametti, S., Picariello, G., Ferranti, P., & Barkholt, V. (2005). Caseinomacropeptide self-association is dependent on whether the peptide is free or restricted in κ-casein *Journal of Dairy Science*, *88*, 4228-4238.

Mills, O. E., & Creamer, L. K. (1975). A conformational change in bovine β-lactoglobulin at low pH. *Biochimica et Biophysica Acta*, *379*, 618-6126.

Minkiewicz, P., Dziuba, J., & Muzinska, B. (1993). The contributions of N-acetylneuroaminic acid in the stabilization of micellar casein. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, *2/433*, 39-48.

Moreno, F. J., López Fandiño, R., & Olano, A. (2002). Characterization and functional properties of lactosyl caseinomacropeptide conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 5179-5184.

Morgan, F., Leónil, J., Mollé, D., & Bouhallab, S. (1999). Modification of bovine β-lactoglobulin by glycationnin a powdered state or in an aqueous solution: effect on association behavior and protein conformation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 83-91.

Morr, C., & Seo, A. (1988). Fractionation and characterization of glycomacropetide from caseinate and skim hydrolysates. *Journal of Food Science*, *53*(1), 80-87.

Mulvihill, D. M., & Donovan, M. (1987). Whey proteins and their thermal denaturation. A review. *Irish Journal of Food Science and Technology*, *11*, 43-75.

Nakano, T., Ikawa, I., & Ozimek, L. (2007). Detection of sialylated phosphorylated κ-casein glycomacropeptide electrophoresed on polyacrylamide gels and cellulose acetate strips by the thiobarbituric acid and malachite green dye reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 2714-2726.

Nakano, T., & Ozimek, L. (1998). Gel chromatography of glicomacropeptide (GMP) from sweet whey on Sephacryl S-200 at different pH´s and Dephadex G-75 in 6 M guanidine hydrochloride. . *Milchwissnschaft*, *53*, 629-633.

Nakano, T., & Ozimek, L. (2000). Purification of glycomacropeptide from dialyzed and non-dializable sweet whey by anion-exchange chromatography at different pH values. *Biotechnology Letters*, *22*, 1081-1086.

Ono, T., Yada, R., Yutani, K., & Nakai, S. (1987). Comparison of conformations of κ-casein, para-κ-casein and glycomacropeptide. *Biochimica et Biophysica Acta*, *911*, 318-325.

Pessen, H., Purcell, J. M., & Farrell, H. M. J. (1985). Proton relaxation rates of water in dilute solutions of β-lactoglobulin. Determination of cross relaxation and correlation with structural changes by the use of two genetic variants of a self-associating globular protein *Biochimica et Biophysica Acta*, *828*(1), 1-12.

Qi, X. L., Brownlow, S., Holt, C., & Sellers, P. (1995). Thermal denaturation of β-lactoglobulin: effect of protein concentration at pH 6.75 and pH 8.05. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1248*, 43-49.

Qi, X. L., Holt, C., McNulty, D., Clarke, D. T., Brownlow, S., & Jones, G. R. (1997). Effect of temperature on the secondary structure of β-lactoglobulin at pH 6.7, as determined by CD and IR spectroscopy: a test of the molten globule hypothesis. *Biochemical Journal*, *324*, 341-346.

Relkin, P. (1996). Thermal unfolding of β-lactoglobulin, α-lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *36*(6), 565-601.

Relkin, P. (1998). Reversibility of heat-induced conformational changes and surface exposed hydrophobic clusters of β-lactoglobulin: their role in heat-induced sol-gel state transition. *International Journal of Biological Macromolecules*, *22*, 59-66.

Relkin, P., Launay, B., & Liu, T. X. (1998). Heat- and cold-setting gels of β-lactoglobulin solutions. A DSC and TEM study. *Thermochimica Acta*, *308*, 69-74.

Renard, D., Lefebvre, J., Griffin, M. C. A., & Griffin, W. G. (1998). Effects of pH and salt environment on the association of β-lactoglobulin revealed by intrinsic fluorescence studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, *22*, 41-49.

Roefs, S. P. F. M., & de Kruif, K. (1994). A model for the denaturation and aggregation of β-lactoglobulin. *European Journal Biochemistry*, *226*, 883-889.

Sakurai, K., & Goto, Y. (2007). Principal component analysis of the pH-dependent conformational transitions of bovine β-lactoglobulin monitored by heteronuclear NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(39), 15346-15351.

Schokker, E. P., Singh, H., Pinder, D. N., Norris, G. E., & Creamer, L. K. (1999). Characterization of intermediates formed during heat-induced aggregation of β-lactoglobulin AB at neutral pH. *International Dairy Journal*, *9*, 791-800.

Sharma, M., Haque, Z. U., & Wilson, W. W. (1996). Association tendency of β-lctoglobulin AB purified by gel permeation chromatography as determined by dynamic light scattering under quiescent conditions. *Food Hydrocolloids*, *10*, 323-328.

Silva-Hernández, E., Nakano, T., & Ozimek, L. (2002). Isolation and analysis of κ-casein glycomacropeptide from goat sweet whey. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 2034-2038.

Silva-Hernández, E., Nakano, T., Verdalet-Guzmán, I., & Ozimek, L. (2004). Comparison of glycomacropeptide isolated from raw and pasteurized goat milk. . *Milchwissnschaft*, *59*, 27-31.

Su, R., Qi, W., He, Z., Zhang, Y., & Jin, F. (2008). Multilevel structural nature and interactions of bovine serum albumin during heat-induced aggregation process. *Food Hydrocolloids*, *22*, 995-1005.

Surroca, Y., Haverkamp, J., & Heck, A. J. R. (2002). Towards the understanding of molecular mechanisms in the early stages of heat-induced aggregation of β-lactoglobulin AB. *Journal of Chromatography A*, *970*, 275-285.

Tek, H., Turhan, K., & Etzel, M. (2006). Effect of conductivity, pH, and elution buffer salinity on glycomacropeptide recovery from whey using anion exchange chromatography. *Journal of Food Science*, *70*(4), 295-300.

Thomä-Worringer, C., Sørensen, J., & López Fandiño, R. (2006). Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *International Dairy Journal*, *16*, 1324-1333.

Townend, R., & Timasheff, S. N. (1960). Molecular interactions in β-lactoglobulin, III: Light scattering investigation of the stoichiometry of the association between 3.7 and 5.2. *Journal American Chemistry and Society*, *82*, 3168-3174.

Uhrínová, S., Smith, M. H., Jameson, G. B., Uhrín, D., Sawyer, L., & Barlow, P. N. (2000). Structural changes accompanying pH-induced dissociation of the β-lactoglobulin dimer *Biochemistry*, *39*, 3565-3574.

Van de Weert, M., Benedix Anderson, M., & Frokjaer, S. (2004). Complex coacervation of lysozyme and heparin: Complex characterization and protein stability. *Pharmaceutical Research*, *21*, 2354-2359.

Veith, P. D., & Reynolds, E. C. (2004). Production of a high gel strength whey protein concentrate from cheese whey. *Journal of Dairy Science*, *87*, 931-940.

Verheul, M., Pedersen, J. S., Roefs, S. P. F. M., & de Kruif, K. G. (1999). Association behavior of native β-lactoglobulin *Bipolymers*, *49*, 11-20.

Verheul, M., Roefs, S. P. F. M., & de Kruif, K. G. (1998). Kinetics of heat-induced aggregation of β-lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 896-903.

Vetri, V., & Militello, V. (2005). Thermal induced conformational changes involved in the aggregation pathways of β-lactoglobulin. *Biophysical Chemistry*, *113*, 83-91.

Wang, Q. (2007). Application of low-intensity ultrasound to characterise the microestructure of model food systems. vol. PhD Thesis. Germany: Technischen Universität München.

Wodak, S. J., De Crombrugghe, M., & Janin, J. (1987). Computer studies of interactions between macromolecules. *Progress in Biophysics and Molecular Biololgy*, *49*, 29-63.

SECCIÓN I

Capítulo 2

Interacciones entre β–lg y CMP en geles

I.2. Interacciones CMP–β–lg en geles.

El comportamiento de la β–lg durante la gelificación inducida por calor ha sido ampliamente estudiado en diferentes condiciones *(Clark, Kavanagh & Ross-Murphy, 2001; Langton & Hermansson, 1992; Relkin, Launay & Liu, 1998; Stading & Hermansson, 1991; Stading, Langton & Hermansson, 1992)*. La formación del gel se debe a diferentes tipos de interacciones, tales como interacciones de van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, interacciones electrostáticas y enlaces covalentes (por ejemplo, disulfuro) *(Aguilera, 1995; Kinsella & Whitehead, 1989; Ziegler & Foegeding, 1990)*.

En la primera parte de este capítulo se muestran los resultados obtenidos con la muestra de β–lg utilizada en el presente trabajo a fin de compararse más adelante con el comportamiento en presencia de otros biopolímeros.

Por otro lado, la gelificación de CMP no se ha estudiado tanto y los pocos resultados que se encuentran en la bibliografía son contradictorios, razón por la cual resulta interesante estudiarlo.

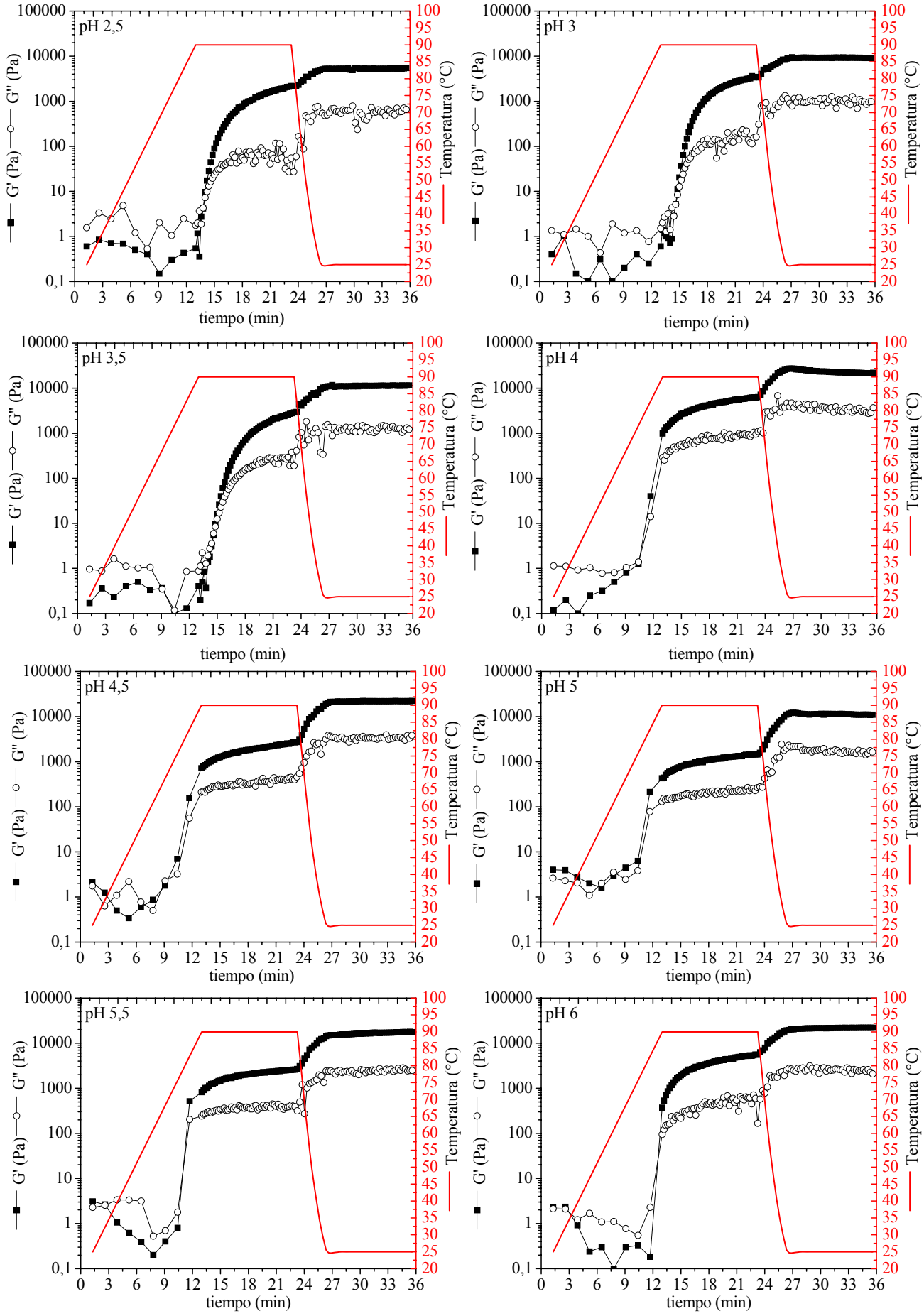
Finalmente, una vez caracterizados ambos componentes solos se evaluará el comportamiento de los sistemas mixtos.

Las condiciones elegidas para este capítulo fueron las siguientes:

- ✓ La β–lg (de Davisco) fue estudiada a una concentración del 15 % p/p (concentración superior a la crítica para gelificar a pH 7) y en el rango de pH 2,5 – 7.
- ✓ El CMP fue evaluado también al 15 % p/p pero sólo a pH 3,5 y 7 (debido a que como se vio en el capítulo anterior a pH menor a 4,5 CMP gelifica aún a temperatura ambiente, por lo cual se seleccionó una condición superior y otra inferior a dicho valor).
- ✓ Los sistemas mixtos estudiados fueron: 25:75, 50:50, 75:25 a una concentración total de proteína del 15 % p/p y a pH 3,5 y 7.

I.2.1. Efecto del pH sobre la gelificación inducida por calor de soluciones de β–lg.

En la **Figura I.2.1** se muestra la dinámica de gelificación de soluciones de β–lg al 15 % p/p en el rango de pH de 2,5 a 7. El cruce de los módulos elástico (*G'*) y viscoso (*G''*) indica el punto de gelificación; a partir del mismo se obtienen los valores de tiempo y temperatura de gelificación (t_{gel} y T_{gel}, respectivamente) *(Clark, 1992)*.


pH 2,5
pH 3
pH 3,5
pH 4
pH 4,5
pH 5
pH 5,5
pH 6
G' (Pa)
G'' (Pa)
Temperatura (°C)
tiempo (min)

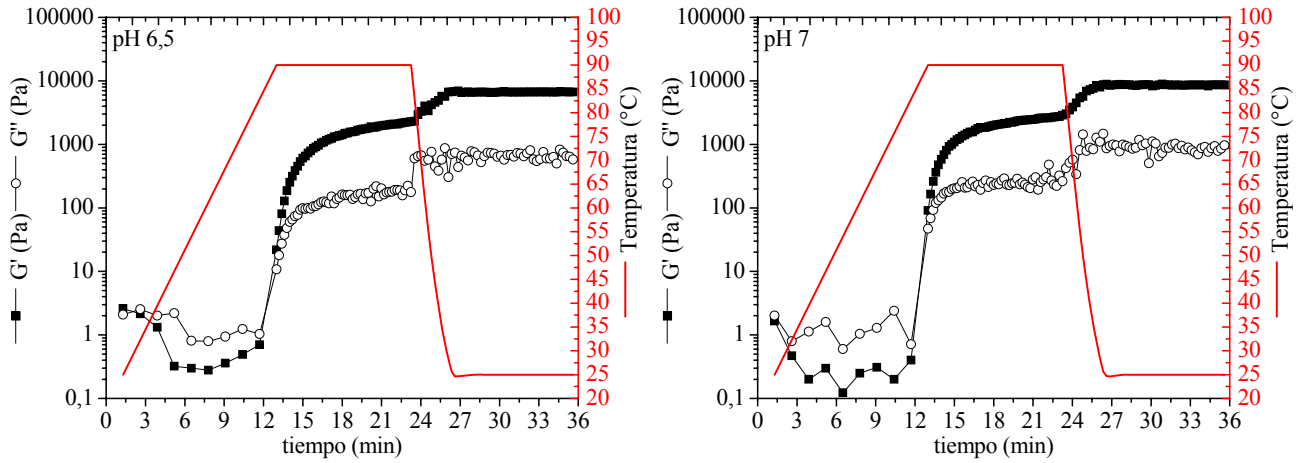


Figura I.2.1. Reogramas de soluciones de β–lg 15 % p/p a diferentes pH en el rango 2,5 – 7.

Luego del punto gel, se produjo un gran incremento del valor de *G′* y *G″* al aumentar la temperatura hasta 90 ºC, seguido por un leve aumento mientras se mantuvo la temperatura constante a 90 °C. Finalmente, se observó un gran incremento durante el enfriamiento de 90 a 25 °C; y durante el tiempo de permanencia a 25 °C los módulos *G'* y *G''* alcanzaron valores casi constantes. Este incremento de los módulos *G'* y *G''* durante el enfriamiento se ha observado para muchas proteínas entre ellas para proteínas del lactosuero y de soja *(Ould Eleya & Turgeon, 2000)* y se debe a una reducción en la entropía, que consolida las fuerzas de atracción (puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals) entre las partículas proteicas en el gel.

Los valores de tiempo (t_{gel}) y temperatura (T_{gel}) de gelificación obtenidos a partir de los reogramas se muestran en la **Figura I.2.2**. En esta figura se muestran también los estados de asociación de la β–lg en las soluciones previo al calentamiento determinados en el capítulo anterior a cada pH (**Figura I.1.10** y **Tabla I.1.1** del apartado **I.1.1**), con el objetivo de relacionar el comportamiento reológico con el estado de asociación de las proteínas antes del tratamiento térmico.

Además, en la misma figura se graficaron también las temperaturas de desnaturalización de soluciones de β–lg a diferentes pH a partir de datos de la literatura *(Bernal & Jelen, 1985; de Wit & Klarenbeek, 1984; Haug, Skar, Vegarud, Langsrud & Draget, 2009; Hegg, 1980; Relkin, 1996; Relkin, Liu & Launay, 1993; Ruegg, Moor & Blanc, 1977)*. A medida que disminuye el pH desde 7 hasta 3,5 la temperatura de desnaturalización (T_d) aumenta desde 74

hasta 84 °C. Una disminución ulterior del pH hasta 2,5 provoca la disminución de T_d hasta 78,5 °C.

Como se mencionó anteriormente, β–lg tiene una carga negativa muy alta a pH neutro, la cual resulta en interacciones repulsivas y buena interacción con el solvente facilitando su desnaturalización. Por otro lado, la temperatura de desnaturalización es máxima en el rango de pH 3 – 4, valores levemente inferiores al pI de β–lg, donde debido a la baja carga eléctrica las repulsiones entre las moléculas proteicas son muy débiles, la conformación de la proteína es más plegada y resistente a la desnaturalización.

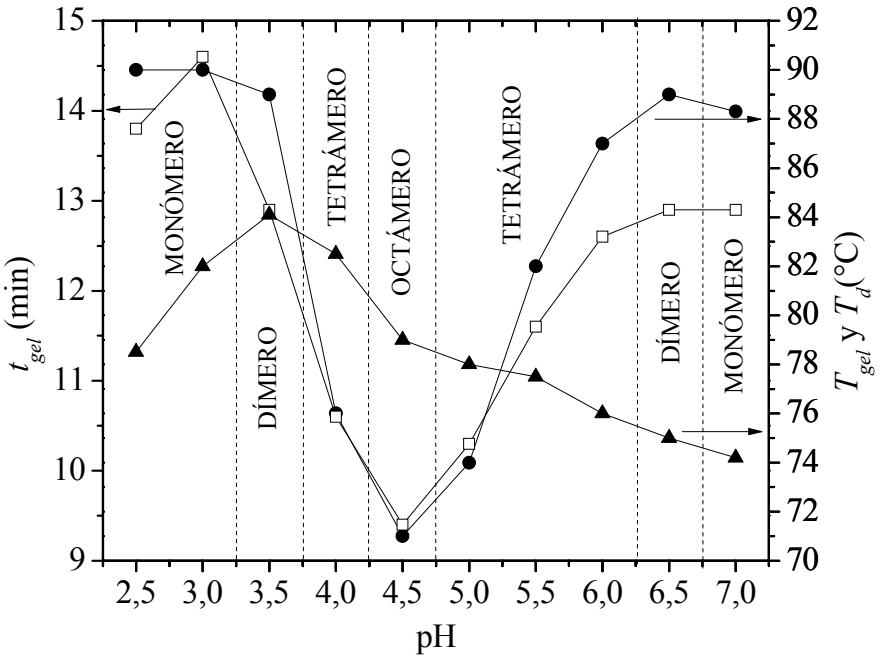


Figura I.2.2. Tiempo (t_{gel}) (□) y temperatura (T_{gel}) (●) de gelificación y temperatura de desnaturalización (T_d) (▲) en función del pH de soluciones al 15 % p/p de β–lg. Se marcan en recuadros los estados de asociación de soluciones de β–lg al 3 % p/p a cada pH (de **Figura I.1.10** y **Tabla I.1.1**).

Se observa que a pH por encima de 5,5 y por debajo de 3,5 la T_d fue menor que la T_{gel}, sugiriendo que a estos pH la desnaturalización es una etapa previa a la gelificación. En esta región la β–lg forma geles a una temperatura superior a la temperatura de desnaturalización. La estructura globular se despliega parcialmente, y la proteína se asocia y forma agregados coloidales. La forma y las propiedades de estos agregados coloidales dependen del pH y la

fuerza iónica de la solución *(Sagis, Veerman, Ganzevles, Ramaekers, Bolder & van der Linden, 2002)*. Posteriormente estos agregados interaccionan para formar un gel. En cambio, en el rango de pH 3,5 – 5,5 la T_d es mayor que la T_{gel}. En la región isoeléctrica la disminución de la repulsión electrostática promueve la gelificación de la proteína mediante la formación de agregados no covalentes por medio de interacciones electrostáticas. De hecho, se observa que en esta región la β–lg asume los mayores estados de asociación (tetrámeros y octámeros). El calentamiento favorecería esta tendencia por la cual formaría una matriz primaria gelificada previo a la desnaturalización.

En la **Figura I.2.3** se muestran los valores de *G'* y *tan δ* al final del enfriamiento en función del pH de las soluciones de β–lg. Como se dijo anteriormente, la viscoelasticidad relativa (*tan δ*) es la relación entre *G''* y *G'*. Los geles en la región isoeléctrica presentaron los mayores valores de *G'* pero menor viscoelasticidad relativa (mayor valor de *tan δ*).

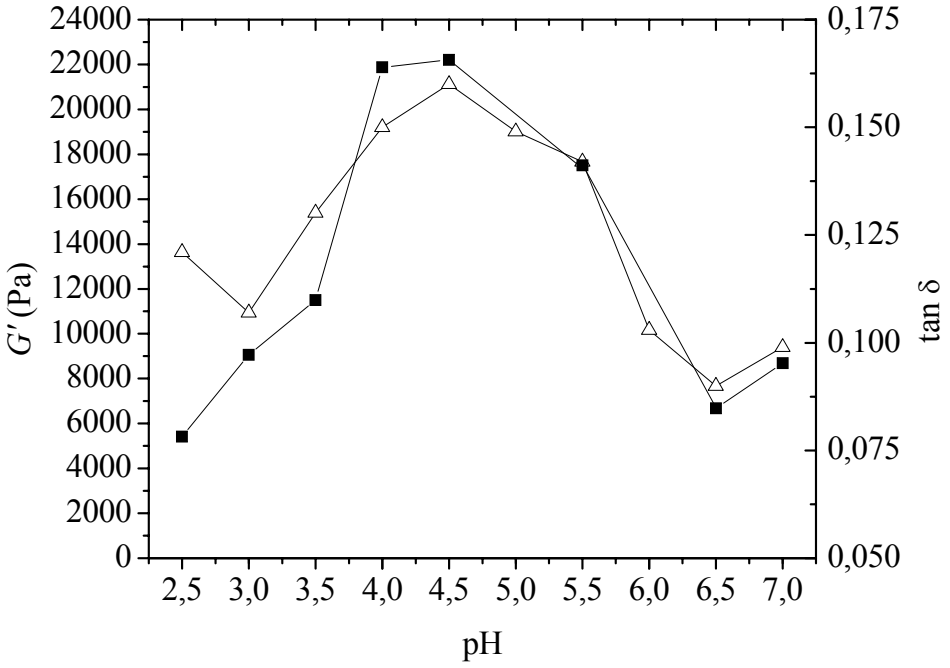
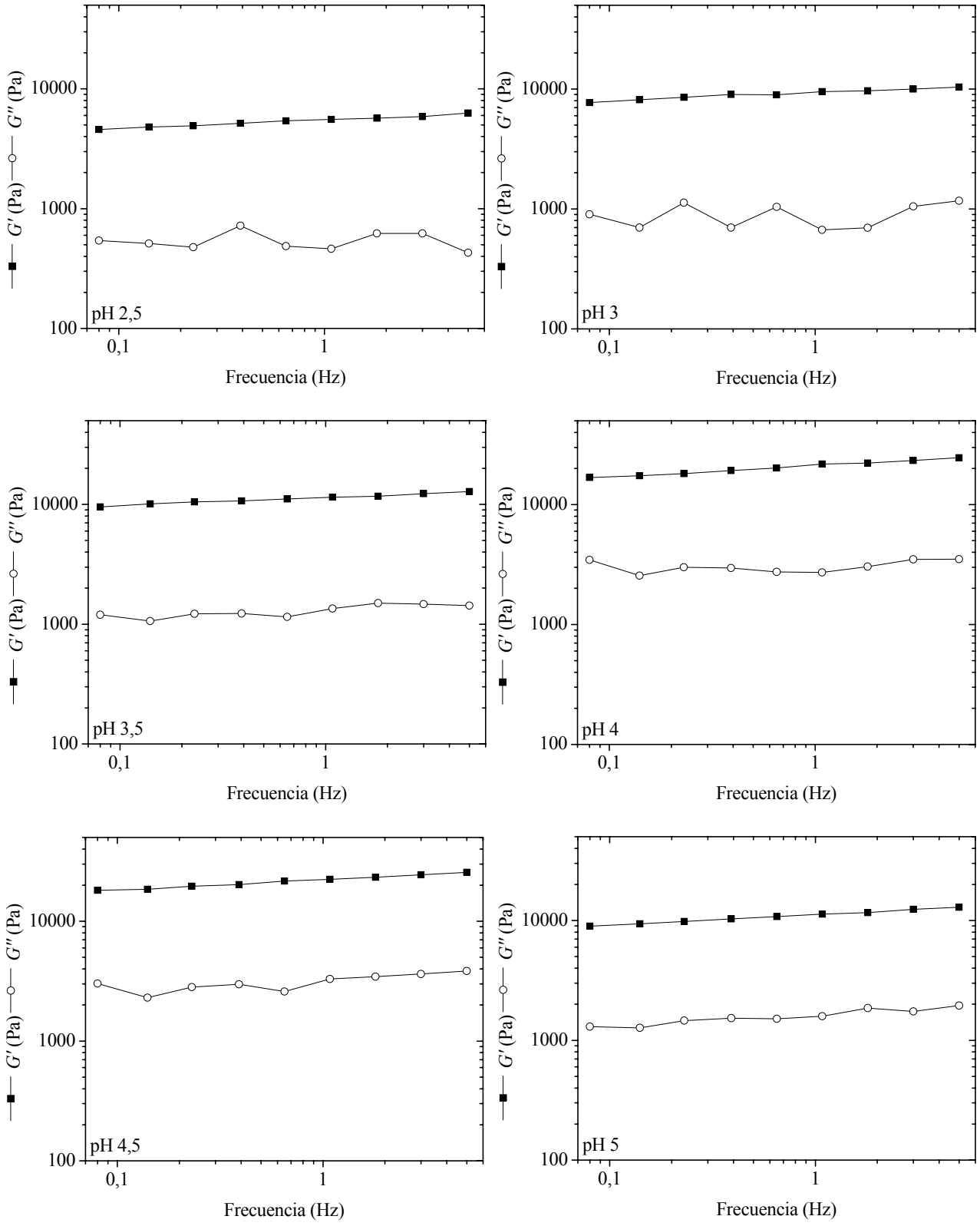


Figura I.2.3. Valores de (■) el módulo elástico (*G'*) y (△) la viscoelasticidad relativa (*tan δ*) al final del enfriamiento en función del pH de soluciones de β–lg al 15 % p/p.

En la **Figura I.2.4** se muestran los barridos de frecuencia de los geles de β–lg obtenidos a los diferentes pH luego del enfriamiento a 25 °C. Se observa que no existe cruce de los módulos

G' y *G''* en todo el rango de frecuencia estudiado, evidenciando la existencia de un gel verdadero.



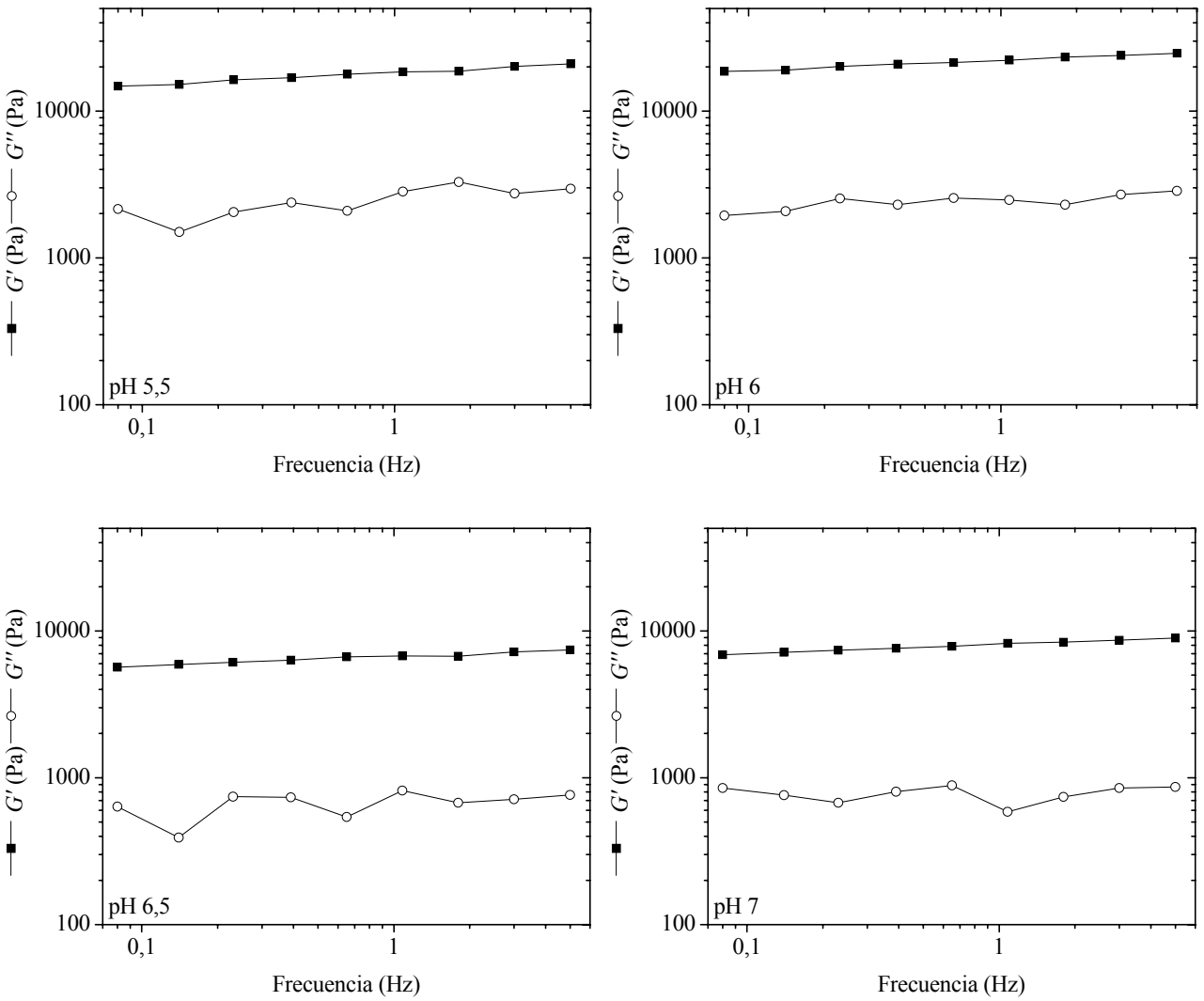


Figura I.2.4. Barrido de frecuencia de los geles de β–lg al 15 % p/p a diferentes pH en el rango 2,5 – 7. Temperatura 25 °C.

El valor de *G'* de un material elástico es independiente de la frecuencia. Sin embargo, los geles alimentarios tienen, aunque pequeña, cierta contribución de la componente viscosa (*G''*) lo que resulta en valores de *G'* dependientes de la frecuencia reflejando la relajación de estos componentes *(Clark & Ross-Murphy, 1987)*. Así, la dependencia de *G'* con la frecuencia es un parámetro característico del tipo de gel.

Como se puede ver en las **Figura I.2.4** el valor de *G'* de los geles de β–lg aumentó levemente con el incremento de la frecuencia.

A partir de la **ecuación 3** definida en **Materiales y Métodos** se determinó la constante *n (Stading & Hermansson, 1992)*. El valor de *n* se considera un indicador de la naturaleza

viscoelástica de los geles: este valor es cero en geles puramente elásticos y es más alto con el incremento de la contribución de la componente viscosa (menos elástico) *(Ikeda & Foegeding, 1999)*.

En la **Figura I.2.5** se muestran los valores de *n* obtenidos en función del pH.

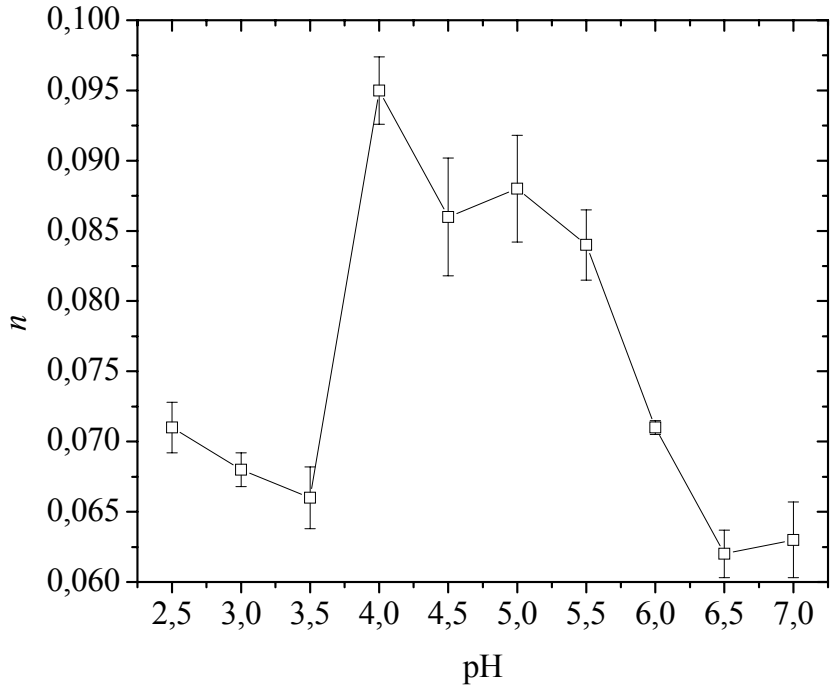


Figura I.2.5. Valor de la constante *n* calculada mediante la **ecuación 3** en función del pH de soluciones de β–lg al 15 % p/p. Se indica el error de al menos dos repeticiones.

Los valores de *n* obtenidos indican la predominancia de la naturaleza elástica de los geles dando valores del orden de 10^{-2}; sin embargo, a valores de pH cercanos al pI (4,6 – 5,2) se obtuvieron valores de *n* notablemente más altos que a pH alejados del pI, indicando un aumento de la contribución viscosa en el rango isoeléctrico. Estos resultados se corresponden con la menor viscoelasticidad relativa (mayor *tan δ*) observada en la región isoeléctrica (**Figura I.2.3**). Además, es posible observar que los errores en los valores de *n* de los geles obtenidos en el rango de pH isoeléctrico fueron mayores que los obtenidos a pH fuera de este rango, lo cual puede explicarse por el hecho de que a pH cercanos al pI ocurren cambios en la conformación de β–lg en el tiempo aún sin tratamiento térmico (**Figuras I.1.12** y **I.1.13** del **Capítulo 1** de esta sección) lo que podría generar diferencias mayores en las repeticiones.

Al terminar la medición en el reómetro se evaluó macroscópicamente la apariencia de los geles y se observó que fueron transparentes a pH por encima de 6 y por debajo de 4 y blancos en el rango 4 – 6 (resultados no mostrados). De acuerdo con la bibliografía, estos resultados corresponden a estructuras de filamentos finos y particulados para pH lejos y cerca del pI, respectivamente. Sin embargo, la estructura de los geles de filamentos finos es diferente a bajos y altos pH *(Ikeda & Morris, 2002; Langton & Hermansson, 1992; Stading & Hermansson, 1991; Stading & Hermansson, 1990)*.

Bajo calentamiento a valores de pH cercanos al punto isoeléctrico (rango de pH 4 – 6) y a alta fuerza iónica, se forman grandes agregados al azar de proteína desnaturalizadas por calor y se obtienen entonces los geles opacos llamados particulados o agregados *(Aymard, Gimel, Nicolai & Durand, 1996; de Kruif et al., 1995; Gimel, Durand & Nicolai, 1994; Griffin & Griffin, 1993; Griffin, Griffin, Martin & Price, 1993; Harwalkar & Kalab, 1985; Langton & Hermansson, 1992; Le Bon, Nicolai & Durand, 1999; Renard, Axelos & Lefebvre, 1995; Stading & Hermansson, 1991; Stading et al., 1992)*. En condiciones de gran repulsión electrostática entre moléculas de β–lg, a valores de pH lejos del punto isoeléctrico y a baja fuerza iónica, se forman pequeños agregados lineales de moléculas de β–lg desnaturalizada y se obtienen geles transparentes llamados de filamentos finos (estructura "fine strands") *(Aymard, Nicolai, Durand & Clark, 1999; Doi, 1993; Kavanagh, Clark & Ross-Murphy, 2000; Langton & Hermansson, 1992; Mudgal, Daubert & Foegeding, 2009; Stading & Hermansson, 1991; Stading & Hermansson, 1990; Stading et al., 1992)* con un diámetro inferior a 4 – 5 nm, valor similar al de un monómero de β–lg *(Langton & Hermansson, 1992)*. Pequeñas variaciones en el pH pueden tener un efecto drástico sobre la estructura de los geles y sobre las propiedades reológicas *(Sagis et al., 2002)*.

Stading & Hermansson (1991) reportaron que los geles particulados son muy diferentes a los de filamentos finos en varios aspectos, ya que los primeros presentaron valores de *G'* más altos, mayor dependencia con la frecuencia y formaron estructuras gelificadas a temperaturas muy por debajo de la temperatura de desnaturalización. Estos resultados coinciden con los mostrados en las **Figuras I.2.1** a **I.2.5**. Además, los mismos autores reportaron también que los geles particulados presentaron menor concentración crítica de gelificación que los geles de filamentos finos.

Además, al sacar la muestra del reómetro se observaron también importantes diferencias en cuanto a la estructura de los geles de filamentos finos obtenidos a pH neutro y a pH ácidos. De hecho, según la bibliografía los filamentos pueden ser rígidos, semi–flexibles, o ramificados. A pH muy por encima del punto isoeléctrico (en el rango 6,5 – 9) los filamentos parecen ser más largos y más flexibles que a pH ácidos, aunque la densidad parece ser más o menos la misma *(Langton & Hermansson, 1992)*. Mientras que por ejemplo, a pH 2 y a una fuerza iónica de 13 mM, la β–lg forma largos filamentos rígidos después de calentar a 80 °C durante 10 h *(Aymard et al., 1999)*. También *Langton & Hermansson (1992)* encontraron que a pH ácidos (3,5) la red estuvo formada por filamentos finos y fue regular, muy densa y con poros muy pequeños. Además, *Stading & Hermansson (1991)* reportaron que los geles de filamentos finos son frágiles a valores bajos de pH y más elásticos o gomosos a valores altos de pH.

Harwalker (1980b) descubrió que el mecanismo de desnaturalización de β–lg a pH < 3 es diferente al que ocurre a pH neutro y sugirió que las interacciones disulfuro tendrían poca contribución sobre la agregación a pH bajo. La reacción de intercambio tiol–disulfuro depende del pH. Aunque a pH menor a 3 no fueron esenciales en la gelificación inducida por calor de β–lg, los puentes disulfuro contribuyeron al proceso de gelificación de la misma *(Errington & Foegeding, 1998)*. Debido a que a pH 2 existen muy pocas o ninguna interacción intermolecular tiol–disulfuro, el gel que se forma a este pH es muy débil *(Aymard et al., 1999)*.

La dependencia de la estabilidad térmica de la β–lg con el pH está fuertemente relacionada con la carga electrostática y con la actividad del grupo tiol *(Donovan & Mulvihill, 1987)*. Durante la transición conformacional de β–lg en el rango de pH 6 – 9 ocurre un aumento de la actividad del grupo tiol, debido a que el pK del grupo tiol es ~ 8 *(Dunnill & Green, 1966)*; por lo tanto, las reacciones de intercambio tiol–disulfuro son más probables en este rango de pH. En las soluciones de β–lg a pH ácido, la formación de puentes disulfuro intra e inter–moleculares estaría suprimida debido a la baja reactividad de los grupos tiol en ese rango de pH *(Harwalkar, 1980a; Harwalkar, 1980b; Kella & Kinsella, 1988; Liu, Relkin & Launay, 1994; Mills & Creamer, 1975; Relkin, Eynard & Launay, 1992; Wada, Fujita & Kitabatake, 2006)* o quizás también porque a pesar de que la conformación de β–lg cambia bajo calentamiento a pH ácido, el grupo tiol no se expone completamente a la superficie de la molécula y la reacción de intercambio tiol–disulfuro intermolecular parece que revierte a su

forma original en el enfriamiento *(Wada et al., 2006)*. Estas podrían ser al menos algunas de las razones por las cuales se observan grandes diferencias macroscópicas en los tipos de geles obtenidos por encima y por debajo de la zona isoeléctrica.

Como se dijo antes, en el rango de pH 4 – 6, β–lg forma geles particulados y opacos. La red del gel particulado se compone de agregados casi esféricos unidos entre sí formando los filamentos de la red. Además, los geles particulados puede separarse en dos categorías: geles con estructura irregular alrededor de pH 4,5 y geles con estructura regular a pH entre 5 y 6 *(Langton & Hermansson, 1992)*.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo y de los resultados encontrados en la literatura podemos resumir de la siguiente manera los diferentes mecanismos involucrados en la desnaturalización, agregación y gelificación de β–lg a diferentes valores de pH (**Figura I.2.6**).

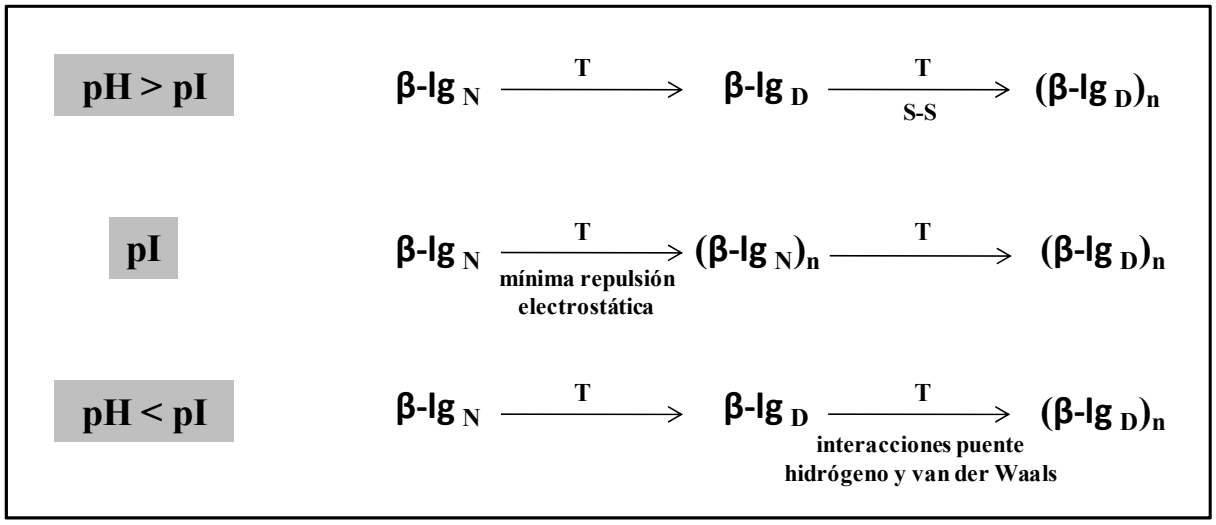


Figura I.2.6. Representación esquemática de los mecanismos de gelificación de β–lg a diferentes valores de pH. Donde: **β–lg$_N$** es la molécula de β–lg nativa, **β–lg$_D$** es la molécula de β–lg desnaturalizada, **(β–lg$_N$)$_n$** es un agregado de n moléculas de β–lg nativa, **(β–lg$_D$)$_n$** es un agregado de n moléculas de β–lg desnaturalizada, **T** es temperatura y **S–S** son las uniones por puente disulfuro.

Así:

i) a valores de pH mayores a 6 la molécula de β–lg nativa se desnaturaliza bajo calentamiento y luego la molécula desnaturalizada se agrega por medio de uniones disulfuro. Finalmente, si la concentración es suficientemente alta estos agregados

interaccionan formando la estructura del gel. Como se vio en la **Figura I.2.2** la T_d de β–lg en esta región es mucho menor que la T_{gel}.

ii) a valores de pH en la región isoeléctrica (3,5 < pH < 6) la molécula de β–lg nativa se agrega bajo calentamiento por uniones no covalentes debido a la existencia de mínimas repulsiones electrostáticas. De este modo, se forman agregados de β–lg nativa que luego se desnaturalizan a mayores temperaturas. En esta región la T_d (78 – 82,5 °C) de la β–lg es superior a la T_{gel} (71 – 76 °C).

iii) finalmente, a valores de pH inferiores a 3,5, la proteína nativa se desnaturaliza por calor y luego se agrega mediante interacciones más débiles, como fuerzas de van der Waals, y puente hidrógeno ya que en este rango de pH la desnaturalización de la molécula no expone los residuos tiol disminuyendo así la reactividad de la molécula para el intercambio tiol/disulfuro y formando así geles más débiles.

I.2.2. Gelificación de CMP.

Existen pocos estudios sobre la gelificación del CMP. *Burton & Skudder (1987)* encontraron que una solución de CMP a pH 4,5 y 20 °C gelificaba al 9,3 % p/p. Por otro lado, *Wang (2007)* también encontró que CMP gelificaba pero a pH menores a 4.

Como se mostró antes, el CMP a pH menor a 4,5 se asocia a temperatura ambiente lo cual, en el tiempo, conduce a la formación de geles opacos.

La concentración mínima para que se produzca la gelificación de CMP en frío fue dependiente del pH. Por debajo de pH 4, CMP gelifica, incluso a bajas concentraciones (3 % p/p), pero los tiempos necesarios para la gelificación son largos (150 – 370 h). Cuando la concentración de CMP es mayor a 7 – 8 % p/p, el tiempo de gelificación es más corto (< 50 h) que para concentraciones más bajas y se mantiene prácticamente constante. A un pH superior a 4, no se observó gelificación.

Como se vio en el apartado **I.1.2**, el modelo propuesto para explicar el autoensamblaje del CMP y la formación de una estructura gelificada a temperatura ambiente incluye un primer paso de asociación hidrofóbica para formar dímeros que interactúan después, en una segunda etapa, por enlaces electrostáticos para formar geles.

Además se ha mostrado en dicho apartado que se produce un aumento de la velocidad de la primera etapa del proceso de autoensamblaje que implica interacciones hidrofóbicas entre monómeros de CMP al aumentar la temperatura, lo cual aumentaría la velocidad global de gelificación.

La **Figura I.2.7** muestra la dinámica de gelificación del CMP a pH 3,5, durante el calentamiento hasta 90 ºC, manteniendo la muestra en estas condiciones durante 10 minutos y enfriando finalmente hasta 25 ºC.

El punto de cruce entre G' y G'' permite estimar el tiempo y la temperatura de gelificación de CMP (9,4 min y 70 ºC, respectivamente). Después de ese tiempo, el valor de G' continuó aumentando hasta alcanzar los 90 ºC, donde se estabilizó.

Es de notar que, el valor de G' no continuó aumentando durante el enfriamiento, o al menos no en la medida en que suele ocurrir en general para otras proteínas, cuyas estructuras se ven reforzadas por un mayor número de uniones puentes de hidrógeno, al descender la temperatura *(Bryant & McClements, 1998)*.

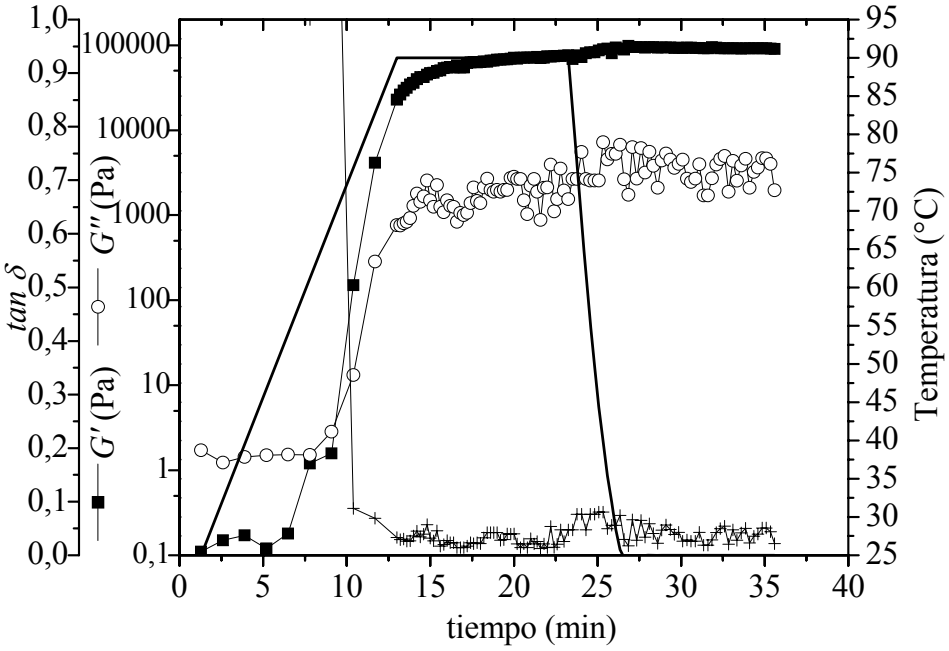


Figura I.2.7. Evolución de *G'* (■), *G''* (○) y *tan δ* (+) durante la gelificación inducida por calor de una solución de CMP al 15 % p/p a pH 3,5. También se indica el perfil de temperatura (–).

La viscoelasticidad relativa del gel de CMP fue muy alta con un valor de *tan δ* de 0,044.

Se corroboró la ausencia de gelificación del CMP a pH 7 ya que no se observó cruce entre *G′* y *G″*, incluso a concentraciones tan altas como 40 % p/p.

I.2.3. Gelificación de los sistemas mixtos CMP:β–lg

A pH neutro, la concentración mínima necesaria para la gelificación de β–lg determinada por el test de inclinación (tilting test) fue de 12 % p/p, mientras que a pH 3,5 fue posible formar geles a concentraciones menores (8 % p/p) (datos no mostrados).

En los reogramas de todos los sistemas mixtos se observó el cruce de los módulos *G′* y *G″* a ambos valores de pH, lo que indica que las mezclas gelificaron y además ambos módulos presentaron un aumento durante el enfriamiento de 90 a 25 °C, como se vio para las soluciones de β–lg, lo cual indica que la β–lg es quien domina el proceso de gelificación de estos sistemas mixtos.

La **Figura I.2.8** muestra la evolución de *G′* para los sistemas mixtos CMP:β–lg a pH 3,5, durante el calentamiento hasta 90 ºC y posterior enfriamiento hasta 25 ºC, en comparación con los componentes individuales (CMP y β–lg puros).
A pH 3,5 gelificaron todos los sistemas mixtos, incluso cuando la concentración de β–lg en los mismos fue inferior al 8 % p/p, que es la concentración crítica de gelificación de β–lg a este valor de pH. Sin embargo, este comportamiento no llama la atención ya que CMP gelifica a pH 3,5, incluso a concentraciones muy bajas y a temperatura ambiente como se dijo en el apartado **I.1.2** del capítulo anterior.
La evolución del valor de *G'* para los sistemas mixtos CMP:β–lg 25:75 y 50:50 a pH 3,5 fue similar a la obtenida para la solución de β–lg pura, pero con un desarrollo de *G'* más rápido durante el período de permanencia a 90 ºC, lo cual revela la presencia de CMP. Por otro lado, el valor de *G'* para el sistema CMP:β–lg 75:25 aumentó más lentamente que los componentes solos durante el período de calentamiento y alcanzó valores inferiores durante el enfriamiento. Estos resultados mostrarían que la gelificación del CMP está impedida por la presencia de β–lg. De hecho, la evolución de *G'*, que indica la evolución del carácter sólido de los geles, disminuye conforme aumenta el contenido de CMP en la mezcla.
Este comportamiento antagónico se observa mejor en la **Figura I.2.8B**, donde se representan los valores de *G'* y *tan δ*, después del enfriamiento a 25 ºC. En esta figura se puede observar que a pH 3,5 el gel de CMP presentó valores de *G'* casi diez veces mayores que los correspondientes al gel de β–lg.

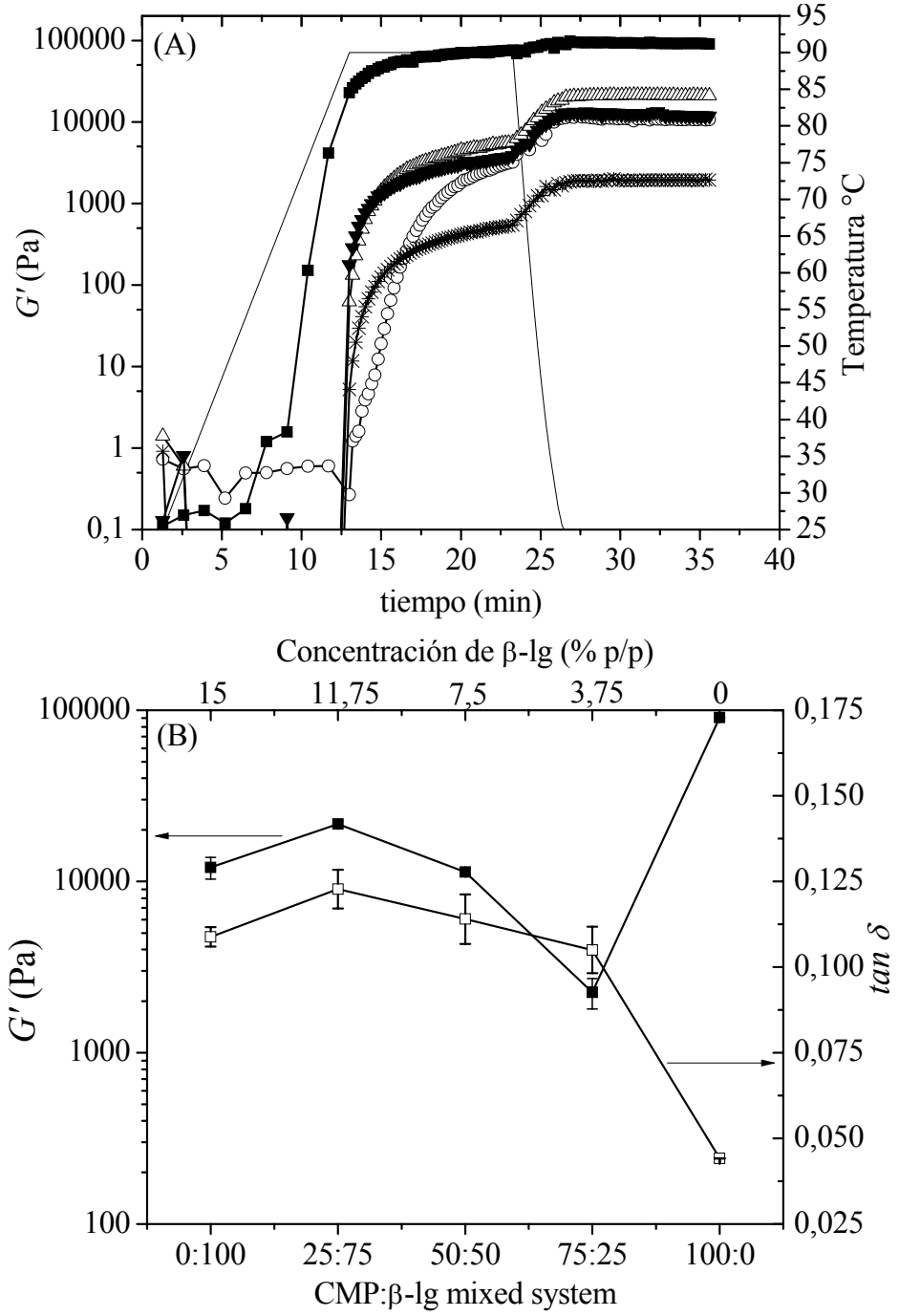


Figura I.2.8. Evolución de *G'* durante la gelificación inducida por calor de los sistemas mixtos CMP:β–lg en diferentes relaciones: 0:100 (○), 25:75 (△), 50:50 (▼), 75:25 (✳) y 100:0 (■) a pH 3,5. También se indica el perfil de temperatura (–). Concentración total de proteína: 15 % p/p. (B): *G'* (símbolos llenos) y *tan δ* (símbolos vacíos) de los sistemas mixtos CMP:β–lg al final del enfriamiento a pH 3,5.

Para los sistemas con una relación CMP:β–lg 25:75, *G'* presentó un valor proporcional al contenido de cada proteína, pero para los sistemas con relaciones 50:50 y 75:25 los valores fueron muy inferiores a los esperados si no existieran interacciones. El gel obtenido para el sistema con una relación CMP:β–lg 75:25 presentó un valor de *G'* muy bajo y presentó una textura muy blanda.

La viscoelasticidad relativa del gel de CMP fue muy alta (*tan* δ = 0,044) en comparación con la del gel de β–lg (*tan* δ = 0,109). Los tres geles mixtos presentaron valores similares de *tan* δ, que los obtenidos con β–lg o un poco mayores (menor viscoelasticidad relativa) (**Figura I.2.8B**), indicando una vez más su comportamiento antagónico en la mezcla a este valor de pH.

Esta tendencia es similar a la observada para la agregación térmica de los sistemas mixtos (**Figura I.1.41**), pero el efecto antagónico se magnifica en las propiedades mecánicas de los geles.

La **Figura I.2.9** muestra el comportamiento de los sistemas a pH neutro. En la **Figura I.2.9A** se observa la evolución de *G'* para los sistemas mixtos CMP:β–lg a pH 7 durante el calentamiento hasta 90 ºC y posterior enfriamiento a 25 ºC, en comparación con β–lg sola. Como se dijo anteriormente, CMP no gelifica a pH 7. Por lo tanto, las curvas de esta figura reflejan principalmente la gelificación de β–lg.

Curiosamente, a pH 7 los tres sistemas mixtos gelificaron a pesar de que: (i) CMP no gelifica ni siquiera a concentraciones muy altas y (ii) la concentración de β–lg en las mezclas 50:50 y 75:25 fue más baja que la concentración crítica de gelificación de β–lg a este pH (12 % p/p). De hecho, la concentración de β–lg en las mezclas fue de 7,5 y 3,75 % p/p, respectivamente. El comportamiento observado sugiere que a pH 7 existe una interacción sinérgica entre CMP y β–lg.

El gel de β–lg fue transparente y duro y los que contenían CMP fueron blancos y cada vez menos duros conforme aumentaba el contenido de CMP. El gel CMP:β–lg 25:75 presentó un comportamiento particular, ya que presentó un valor de *G'* mucho más alto que el esperado (57 kPa), en comparación con β–lg sola (8 kPa). La concentración de β–lg en este sistema (11,75 % p/p) permite que la proteína gelifique, pero la presencia de CMP (3,75 % p/p)

aumentó en gran medida su carácter elástico. Este comportamiento sugiere un fuerte efecto sinérgico en esta relación CMP:β–lg.

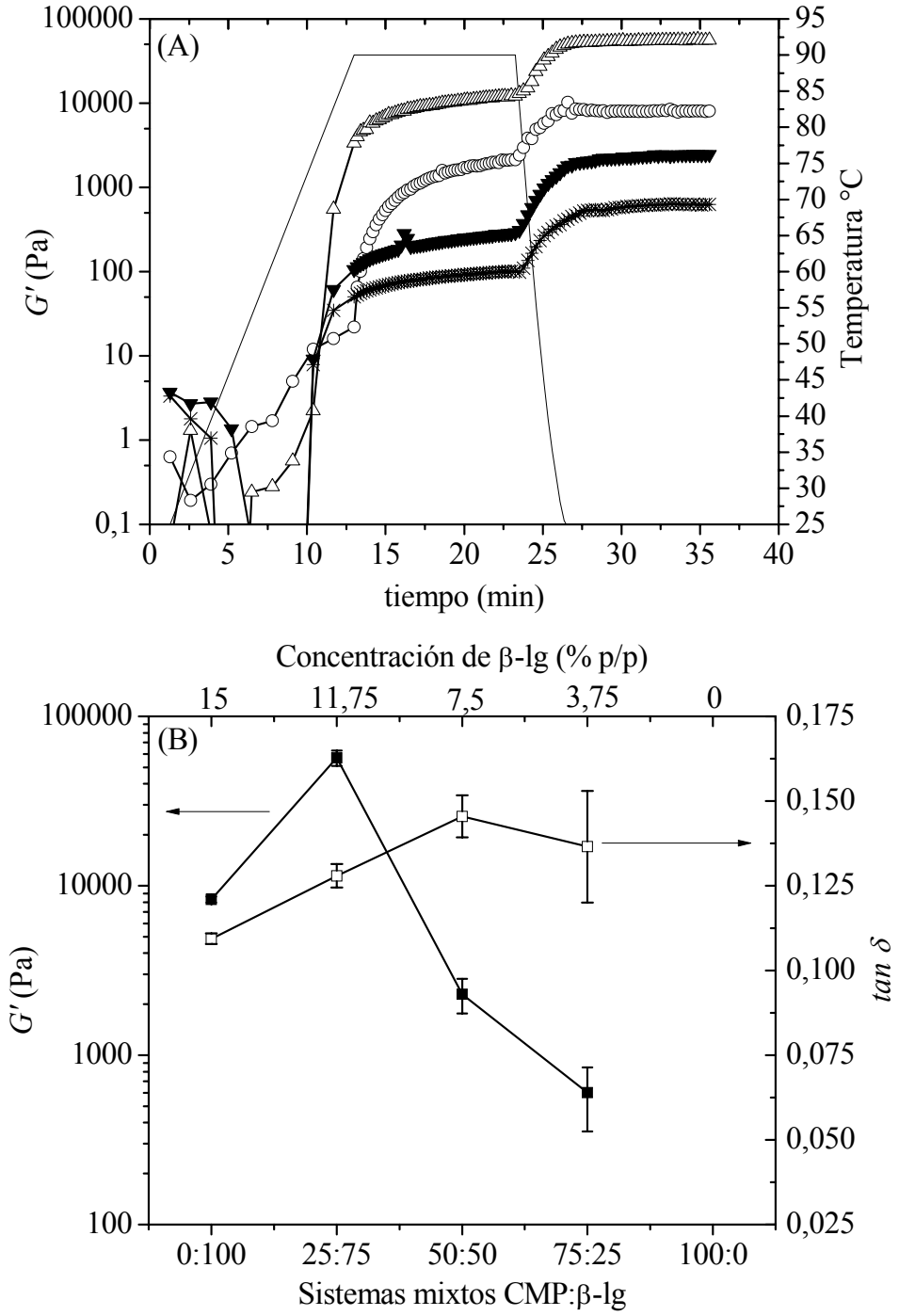


Figura I.2.9. (A) Evolución de *G'* durante la gelificación inducida por calor de los sistemas mixtos CMP:β–lg en diferentes relaciones: 0:100 (○), 25:75 (△), 50:50 (▼) y 75:25 (✳) a pH 7. También se indica el perfil de temperatura (–). Concentración total de proteína: 15 % p/p. (B): *G'* (símbolos llenos) y *tan δ* (símbolos vacíos) de los sistemas mixtos CMP:β–lg al final del enfriamiento a pH 7.

Veith & Reynolds (2004) informaron que a pH 7 la presencia de CMP en muestras de WPC fue perjudicial para algunas características del gel como la dureza y la capacidad de retención de agua. Este resultado coincide con el comportamiento observado para los geles mixtos CMP:β–lg 50:50 y 75:25, que mostraron valores de *G'* mucho más bajos que los obtenidos para los geles de β–lg pura. Sin embargo, es importante resaltar que β–lg gelificó a pesar de que a pH 7 no se esperaba la formación de geles de β–lg pura, ya que estos sistemas tienen concentraciones de esta proteína que son inferiores al 12 % p/p (concentración crítica de gelificación de β–lg), y más aún teniendo en cuenta que la contribución del CMP en el proceso de gelificación es nula a este pH (**Figura I.2.9B**).

La **Figura I.2.10** muestra la temperatura de gelificación (T_{gel}) para los sistemas mixtos y para los componentes individuales.

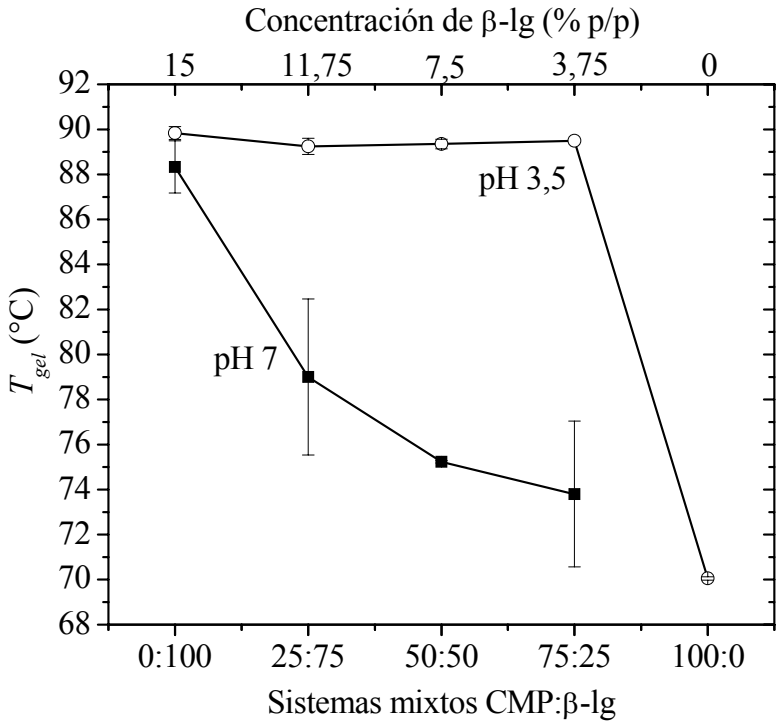


Figura I.2.10. Temperatura de gelificación (T_{gel}) de los sistemas CMP:β–lg a pH 7 (■) y pH 3,5 (○).

A pH 7, T_{gel} disminuyó desde 88 °C hasta 74 °C, con el aumento de la concentración de CMP desde 0 hasta 11,25 % p/p, pero la disminución más importante se observó para el sistema CMP:β–lg 25:75. Este resultado coincide con los resultados obtenidos por calorimetría

diferencial de barrido (**Tabla I.1.2** del apartado **I.1.3** del capítulo anterior), donde el mayor descenso del valor de las temperaturas de inicio y pico se observó para esta mezcla. Esto indica que la desnaturalización de la β–lg sería la etapa determinante en la gelificación a pH 7 de esta proteína o de la mezcla con CMP. El CMP disminuye la estabilidad térmica de la β–lg mediante la formación de estructuras ensambladas en solución como fue observado en el apartado mencionado anteriormente.

A pH 3,5 T_{gel} de los sistemas mixtos fue constante e igual a T_{gel} de β–lg (90 ºC), a pesar de que la T_{gel} de CMP solo fue muy baja (70 °C). A este pH, parece que la desnaturalización de β–lg no es la etapa controlante del proceso de gelificación, ya que el descenso de T_o y T_p de desnaturalización de β–lg con el aumento de la concentración de CMP en los sistemas mixtos desde 79,37 a 74,94 °C y de 84,1 a 82,43 °C para T_o y T_p, respectivamente (**Tabla I.1.3**), no se refleja en T_{gel}. Por lo tanto, la agregación sería la etapa que controlaría la gelificación a pH 3,5.

Estos resultados pueden relacionarse con los analizados en el apartado **I.2.1** de este capítulo respecto a la gelificación de β–lg a pH lejos o cerca del rango isoeléctrico (**Figura I.2.2**).

Luego de terminado el tratamiento térmico y el enfriamiento, se realizaron los barridos de frecuencia de los geles obtenidos a pH 3,5 y 7. En todos los casos se observó que el valor de *G'* fue superior al de *G''* en todo el rango de frecuencia aplicada.

En la **Figura I.2.11** se muestran los valores de *G'* en función de la frecuencia. El valor de *G'* de los geles CMP:β–lg aumentó levemente con el incremento de la frecuencia aplicada en todas las relaciones estudiadas.

A pH 3,5 el CMP solo (relación CMP:β–lg 100:0) presentó el mayor valor de *G'* en todo el rango de frecuencia estudiado lo que se corresponde con los resultados observados en la **Figura I.2.8**. Y del mismo modo que lo observado en dicha figura le siguió en orden decreciente de valor de *G'* el sistema 25:75, luego los sistemas 50:50 y 0:100 con valores muy semejantes y por último nuevamente el sistema 75:25, evidenciando nuevamente el importante efecto antagónico a este pH.

A pH 7 el sistema CMP:β–lg 25:75 presentó el mayor valor de *G'* en todo el rango de frecuencia aplicada. Y del mismo modo que en la **Figura I.2.9**, le siguieron con menores valores de *G'* los sistemas 0:100, 50:50 y por último 75:25 con valores mucho menores que

los anteriores, lo cual se explicó porque a este pH el CMP solo no gelifica. Aunque en la relación 25:75 se observa nuevamente el efecto sinérgico mencionado anteriormente.

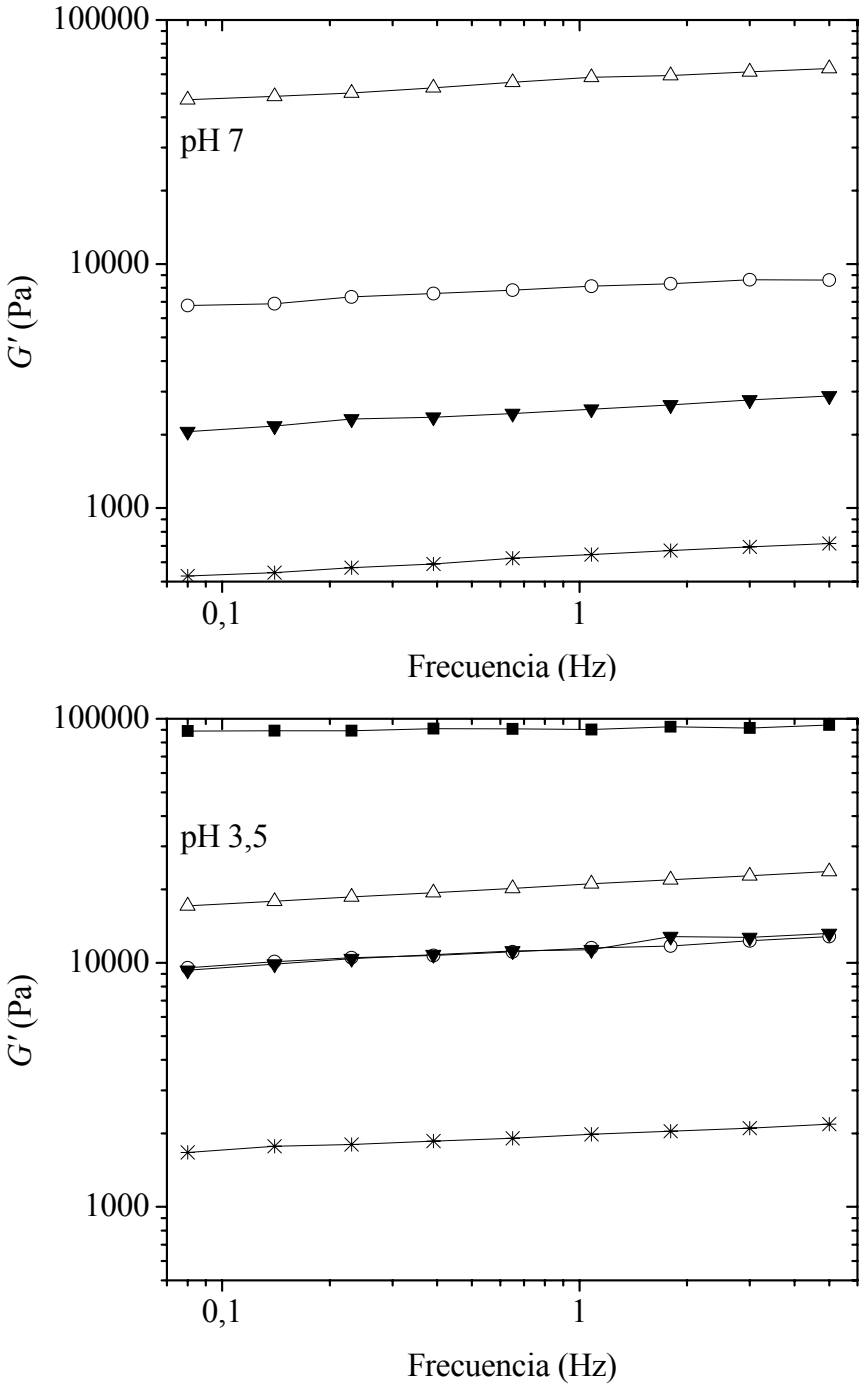


Figura I.2.11. Módulo elástico (*G'*) en función de la frecuencia de oscilación de sistemas CMP–β–lg en diferentes relaciones: 0:100 (○), 25:75 (△), 50:50 (▼), 75:25 (✳) y 100:0 (■) a pH 7 y 3,5. Temperatura 25 °C.

En la **Figura I.2.12** se muestran los valores de *n* correspondientes a la pendiente de las rectas en la **Figura I.2.11** de acuerdo a la **ecuación 3**.

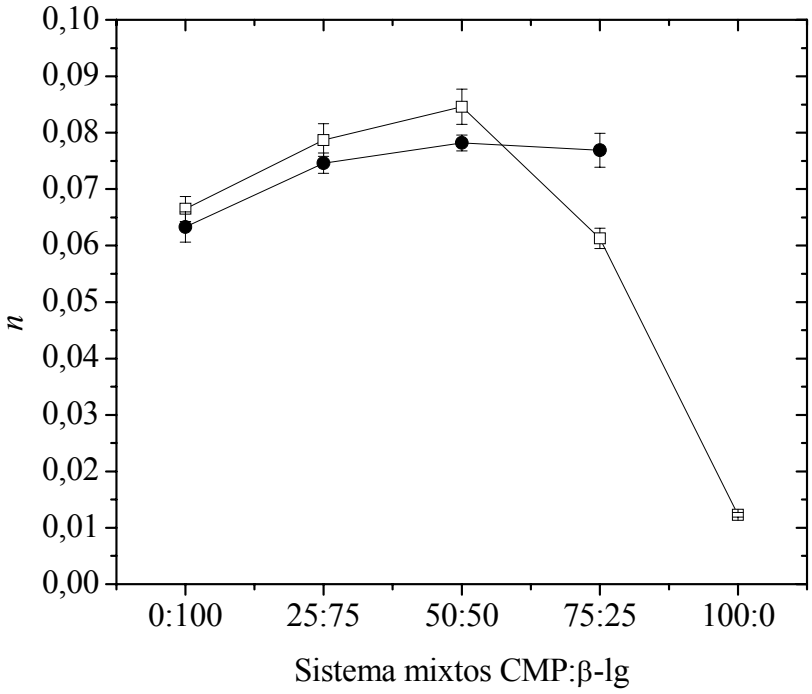


Figura I.2.12. Valor de la constante *n* para geles CMP:β–lg a pH (□) 3,5 y (●) 7 calculada mediante la **ecuación 3**. Se indica el error de al menos dos repeticiones.

Al igual que en el estudio de geles de β–lg a diferentes pH se obtuvieron valores de *n* en el orden de 10^{-2}, indicando la predominancia de la naturaleza elástica; sin embargo, en la solución de CMP solo a pH 3,5 se observó un valor de *n* mucho más bajo evidenciando un mayor carácter elástico.

El comportamiento durante la gelificación de mezclas de β–lg y CMP y durante la agregación (**Capítulo 1** de esta sección) se puede explicar a partir de los resultados obtenidos mediante dispersión dinámica de luz y calorimetría diferencial de barrido (mostrados en el apartado **I.1.3** del **Capítulo 1** de esta sección) los cuales evidenciaron la existencia de interacciones no covalentes entre CMP y β–lg en soluciones de muy baja fuerza iónica (sin adición de sales) a temperatura ambiente, a ambos pH (3,5 y 7), modulado por la proporción CMP:β–lg en las mezclas. La asociación entre CMP y β–lg a pH 3,5 probablemente involucraría interacciones más fuertes que a pH 7 debido a la carga eléctrica de cada proteína a pH ácido.

El efecto antagónico observado en la agregación a pH 3,5 (**Capítulo 1** de esta sección) y en las propiedades mecánicas de los geles a pH 3,5 (**Figura I.2.8**) se relaciona a la formación de complejos electrostáticos fuertes entre CMP y β–lg. De hecho, β–lg a pH 3,5 está muy por debajo de su punto isoeléctrio (pI), el cual como se mencionó antes se encuentra entre 4,6 y 5,2 *(Bromley, Krebs & Donald, 2005; Das & Kinsella, 1989; Harnsilawat, Pongsawatmanit & McCelments, 2006)*, y su potencial zeta es alrededor de +20 mV *(Harnsilawat et al., 2006)*, valor que representa una fuerte carga neta positiva.

CMP, por su lado, es afectado por cambios en el pH debido a que contiene dos residuos de Asp, siete u ocho de Glu (dependiendo de la variedad genética B o A, respectivamente), uno de fosfo–Ser y tres de Lys *(Dziuba & Minkiewicz, 1996)*. Por debajo de su pI, las moléculas de CMP pierden la carga negativa de los residuos de Glu y Asp, también el grupo carboxilo en el C–terminal y el residuo de ácido siálico en el gCMP. A pH 3,5, la forma no glicosilada del CMP (aCMP) se encuentra por debajo de su pI (4,15) y presenta un valor de potencial zeta de alrededor de +5 mV, mientras que la forma glicosilada del CMP (gCMP) se encuentra por encima de su pI (3,15) con un valor de potencial zeta de –5 mV, debido a que la carga negativa de los residuos de ácido siálico (pK del ácido siálico: 2,2) reduce la carga neta de la cadena de aminoácidos *(Kreuβ, Strixner & Kulozik, 2009)*. Por eso, a pH 3,5 gCMP que presenta una carga neta negativa puede interactuar electrostáticamente con β–lg. Es más, debido al bajo pK del residuo de ácido siálico (2,2) en esta fracción glicosilada, a pH mayores a 2,2 existiría una carga negativa local sobre el glicano, que le permitiría también interactuar con β–lg.

La asociación entre CMP y β–lg estaría reforzada por interacciones hidrofóbicas. β–lg pertenece a la familia de proteínas lipocalinas, las cuales se caracterizan por presentar una formación de ocho láminas plegadas β (β–barrel) con las que conforman una estructura similar a una canasta que presenta una cavidad central con una zona o "bolsillo" hidrofóbico.

Como la mayoría de las lipocalinas, β–lg puede unir pequeñas moléculas hidrofóbicas dentro de esta cavidad central *(Papiz et al., 1986)*. CMP podría interactuar a través del dominio hidrofóbico N–terminal del CMP (AA 1–5), el cual no está cubierto por una carga negativa primero, seguido por los dominios hidrofóbicos ubicados en el centro de la cadena peptídica.

Como fue explicado en el esquema mostrado en la **Figura I.1.26**, el mecanismo de la gelificación en frio del CMP, incluye una primera etapa de asociación hidrofóbica para formar dímeros, la cual comienza a pH por debajo de 6,5, seguida por interacciones a través de

uniones electrostáticas a pH por debajo de 4,5, para formar geles en el tiempo. El autoensamblaje del CMP a pH 3,5 estaría impedido por la presencia de β–lg cargada positivamente, la cual puede complejarse con el CMP previniendo que este péptido se autoensamble y de este modo previniendo su posterior gelificación, causando una fuerte disminución en el valor de *G'* de los geles mixtos 50:50 o 75:25 (**Figura I.2.8**).

A pH 3,5, la máxima interacción de acuerdo a los resultados de calorimetría diferencial de barrido (**Tabla I.1.3**) y del comportamiento del módulo *G'* (**Figura I.2.8**) ocurre en el sistema 75:25, el cual corresponde a una relación molar CMP:β–lg de 6:1. Este complejo tendría un peso molecular de alrededor de 70 kDa, valor que se aproxima al peso molecular estimado a partir del diámetro hidrodinámico del pico de menor tamaño de la **Figura I.1.38**.

Por otro lado, a pH 3,5, la gelificación de β–lg, cuando está complejada con el CMP, estaría prevenida estéricamente o debido al bloqueo de los dominios hidrofóbicos que interaccionan con el CMP y no están disponibles para interactuar entre ellos durante el calentamiento. Como resultado de estas complejas interacciones, los geles mixtos exhiben un comportamiento antagónico, excepto el sistema 25:75, cuyo valor de *G'* muestra una relación proporcional a cada componente en la mezcla. Para este mismo sistema, los resultados de dispersión dinámica de luz y calorimetría diferencial de barrido mostraron el menor grado de interacción entre CMP y β–lg en solución.

A pH 7 la carga neta de CMP y β–lg es similar, presentando la β–lg un valor de potencial zeta de –20 mV *(Harnsilawat et al., 2006)* y el CMP de –18 y –24 mV para aCMP y gCMP, respectivamente (**Figura I.1.24**) *(Kreuβ et al., 2009)*. Por lo tanto, en esta condición sólo pueden ocurrir débiles interacciones electrostáticas entre CMP y β–lg a través de regiones positivas de β–lg y regiones negativas de CMP.

Este complejamiento débil parece ser beneficioso para la gelificación (acción sinérgica). La contribución de CMP fue prácticamente cero ya que este péptido no gelifica a pH 7 y además, como se dijo anteriormente, dado que la concentración crítica de gelificación para la β–lg pura es de 12 % p/p, no era de esperar que los sistemas 50:50 y 75:25 los cuales tienen 7,5 y 3,7 % p/p de β–lg, respectivamente, gelificaran. A pesar de esto, se formaron geles (**Figura I.2.9**) pero fueron blancos, muy blandos y presentaron un valor de *G'* muy bajo (2291 y 601 Pa). La mezcla 25:75 mostró un comportamiento destacado ya que el valor de *G'* fue mucho mayor que la de la β–lg pura al 15 % p/p. La relación molar CMP:β–lg para esta mezcla fue 1:2, lo

cual tiene un peso molecular de 45 kDa que está de acuerdo también con el peso molecular estimado desde el diámetro hidrodinámico del pico correspondiente (6,5 nm) en la distribución de tamaño de partícula por intensidad (**Figura I.1.33**). Esta clase de asociación débil electrostática facilitaría no sólo la desnaturalización de β–lg (**Tabla I.1.2**) sino también su agregación (**Capítulo 1** de esta sección).

I.2.4. Referencias.

Aguilera, J. M. (1995). Gelation of whey proteins. *Food Technology*, *49*, 83-86, 88-89.

Aymard, P., Gimel, J. C., Nicolai, T., & Durand, D. (1996). Experimental evidence for a two-step process in the aggregation of β-lactoglobulin at pH 7. *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, *93*, 987-997.

Aymard, P., Nicolai, T., Durand, D., & Clark, A. (1999). Static and dynamic scattering of β-lactoglobulin aggregates formed after heat-induced denaturation at pH 2. *Macromolecules*, *32*(8), 2542-2552.

Bernal, V., & Jelen, P. (1985). Thermal stability of whey proteins - a calorimetric study. *Journal of Food Science*, *68*, 2847-2852.

Bromley, E. H. C., Krebs, M. R. H., & Donald, A. M. (2005). Aggregation across the length-scales in β-lactoglobulin. *Faraday Discussions*, *128*, 13-27.

Bryant, C. M., & McClements, D. J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trend in Food Science and Technology*, *9*, 143-151.

Burton, J., & Skudder, P. J. (1987). Whey proteins. UK patent application GB 2188526 A1.

Clark, A. H. (1992). Gels and gelling. En: H. G. Schwartzberg, & R. W. Hartel, *Physical chemistry of foods* (pp. 263-305). New York: Marcel Dekker.

Clark, A. H., Kavanagh, G. M., & Ross-Murphy, S. B. (2001). Globular protein gelation-theory and experiment. *Food Hydrocolloids*, *15*, 383-400.

Clark, A. H., & Ross-Murphy, S. B. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advances in Polymer Science*, *83*, 57-192.

Das, K. P., & Kinsella, J. E. (1989). pH dependent emulsifying properties of β-lactoglobulin *Journal of Dispersion Science and Technology*, *10*(1), 77-102.

de Kruif, K. G., Hoffmann, M. A. M., van Marle, M. E., van Mil, P. J. J. M., Roefs, S. P. F. M., Verheul, M., & Zoon, N. (1995). Gelation of protein form milk. *Faraday Discussions*, *101*, 185-200.

de Wit, J. N., & Klarenbeek, G. (1984). Effects of heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, *67*, 2701-2710.

Doi, E. (1993). Gels and gelling of globular proteins. *Trends in Food Science & Technology*, *4*(1), 1-5.

Donovan, M., & Mulvihill, D. M. (1987). Thermal denaturation and aggregation of whey proteins. *Irish Journal of Food Science and Technology*, *11*, 87-100.

Dunnill, P., & Green, D. W. (1966). Sulphydryl groups and the N ↔ R conformational change in β-lactoglobulin. *Journal of Molecular Biology*, *15*, 147-151.

Dziuba, J., & Minkiewicz, P. (1996). Influence of Glycosylation on Micelle-Stabilizing Ability and Biological Properties of C-terminal Fragments of Cow's κ-Casein. *International Dairy Journal*, *6*, 1017-1044.

Errington, A. D., & Foegeding, E. A. (1998). Factors determining fracture stress and strain of fine-stranded whey protein gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 2963-2967.

Gimel, J. C., Durand, D., & Nicolai, T. (1994). Structure and distribution of aggregates formed after heat-induced denaturation of globular proteins. *Macromolecules*, *27*, 583-589.

Griffin, W. G., & Griffin, M. C. A. (1993). Time-dependent polydispersity of growing colloidal aggregates: predictions from dynamic light scattering. *Journal of Chemical Society, Faraday Trans.*, *89*, 2879-2889.

Griffin, W. G., Griffin, M. C. A., Martin, S. R., & Price, J. (1993). The molecular basis of thermal aggregation of bovine β-lactoglobulin A. *Faraday Transactions*, *89*, 3395-3406.

Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., & McCelments, D. J. (2006). Characterization of β-lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, *20*, 577-585.

Harwalkar, V. R. (1980a). Kinetics of thermal denaturation of β-lactoglobulin at pH 2.5. *Journal of Dairy Science*, *63*, 1052-1053.

Harwalkar, V. R. (1980b). Measurement of thermal denaturation of β-lactoglobulin at pH 2.5. *Journal of Dairy Science*, *63*, 1043-1051.

Harwalkar, V. R., & Kalab, M. (1985). Thermal denaturation and aggregation of β-lactoglobulin in solution. Electron microscopic study. *Milchwissenschaft*, *40*(2), 65-68.

Haug, I. J., Skar, H. M., Vegarud, G. E., Langsrud, T., & Draget, K. I. (2009). Electrostatic effects on β-lactoglobulin transitions during heat denaturation as studied by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, *23*(8), 2287-2293.

Hegg, P. O. (1980). Thermal stability of β-lactoglobulin as function of pH and the relative concentration of sodium dodecyl sulfate. *Acta Agriculturae Scandinavica*, *30*, 401-404.

Ikeda, S., & Foegeding, E. A. (1999). Dynamic viscoelastic properties of thermally induced whey protein isolate gels with added lecithin. *Food Hydrocolloids*, *13*(3), 245-254.

Ikeda, S., & Morris, V. J. (2002). Fine-stranded and particulate aggregates of heat denatured whey protein visualized by atomic force microscopy. *Biomacromolecules*, *3*, 382-389.

Kavanagh, G. M., Clark, A. H., & Ross-Murphy, S. B. (2000). Heat-induced gelation of globular proteins: part 3. Molecular studies on low pH β-lactoglobulin gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, *28*(1), 41-50.

Kella, D., & Kinsella, J. E. (1988). Enhanced thermodynamic stability of β-lactoglobulin at low pH. A possible mechanism. *Biochemical Journal*, *255*, 113-118.

Kinsella, J. E., & Whitehead, D. M. (1989). Protein in whey: chemical, physical, and functional properties. *Advances in Food and Nutrition Research*, *33*, 343-391.

Kreuβ, M., Strixner, T., & Kulozik, U. (2009). The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropeptide. *Food Hydrocolloids*, *23*(7), 1818-1826.

Langton, M., & Hermansson, A. M. (1992). Fine-stranded and particulate gels of β-lactoglobulin and whey protein at varying pH. *Food Hydrocolloids*, *5*, 523-539.

Le Bon, C., Nicolai, T., & Durand, D. (1999). Growth and structure of aggregates of heat-denatured β-lactoglobulin *International Journal of Food Science and Technology*, *34*, 451-465.

Liu, T. X., Relkin, P., & Launay, B. (1994). Thermal denaturation and heat-induced gelation properties of β-lactoglobulin. Effects of some chemical parameters. *Thermochimica Acta*, *246*, 387-403.

Mills, O. E., & Creamer, L. K. (1975). A conformational change in bovine β-lactoglobulin at low pH. *Biochimica et Biophysica Acta*, *379*, 618-6126.

Mudgal, P., Daubert, C. R., & Foegeding, E. A. (2009). Cold-set thickening mechanism of β-lactoglobulin at low pH: Concentration effects. *Food Hydrocolloids*, *23*(7), 1762-1770.

Ould Eleya, M. M., & Turgeon, S. L. (2000). Rheology of κ-carrageenan and β-lactoglobulin mixed gels. *Food Hydrocolloids*, *14*, 29-40.

Papiz, M. Z., Sawyer, L., Eliopoulus, E. E., North, A. C. T., Findlay, J. B. C., Sivaprasadarao, R., Jones, T. A., Newcomer, M. E., & Kraulis, P. J. (1986). The structure of β-lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*, *324*, 205-231.

Relkin, P. (1996). Thermal unfolding of β-lactoglobulin, α-lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *36*(6), 565-601.

Relkin, P., Eynard, L., & Launay, B. (1992). Thermodynamic parameters of β-lactoglobulin and α-lactalbumin. A DSC study of denaturation by heating. *Thermochimica Acta*, *204*, 111-121.

Relkin, P., Launay, B., & Liu, T. X. (1998). Heat- and cold-setting gels of β-lactoglobulin solutions. A DSC and TEM study. *Thermochimica Acta*, *308*, 69-74.

Relkin, P., Liu, T., & Launay, B. (1993). Effects of pH on gelation and emulsification of a β-lactoglobulin concentrate. *Journal of Dispersion Science and Technology*, *14*(3), 335-354.

Renard, D., Axelos, M. A. V., & Lefebvre, J. (1995). Investigation of sol-gel transitions of β-lactoglobulin by rheological and small-angle neutron scattering measurements En: E. Dickinson, & D. Lorient, *Food Macromolecules and Colloids* (pp. 390-399). Cambridge, UK: Royal Society Chemistry.

Ruegg, M., Moor, V., & Blanc, B. (1977). A calorimetric study of thermal denaturation of whey proteins in simulated milk ultrafiltrate. *Journal of Dairy Research*, *44*, 500-520.

Sagis, L. M. C., Veerman, C., Ganzevles, R., Ramaekers, M., Bolder, S. G., & van der Linden, E. (2002). Mesoscopic structure and viscoelastic properties of β-lactoglobulin gels at low pH and low ionic strength. *Food Hydrocolloids*, *16*(3), 207-213.

Stading, M., & Hermansson, A.-M. (1991). Large deformation properties of β-lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids*, *5*(4), 339-352.

Stading, M., & Hermansson, A. M. (1990). Viscoelastic behaviour of β-lactoglobulin structures. *Food Hydrocolloids*, *4*(2), 121-135.

Stading, M., & Hermansson, A. M. (1992). Inhomogeneous fine-stranded β-lactoglobulin gels. *Food Hydrocolloids*, *5*, 455-470.

Stading, M., Langton, M., & Hermansson, A.-M. (1992). Inhomogeneous fine-stranded β-lactoglobulin gels. *Food Hydrocolloids*, *6*(5), 455-470.

Veith, P. D., & Reynolds, E. C. (2004). Production of a high gel strength whey protein concentrate from cheese whey. *Journal of Dairy Science*, *87*, 931-940.

Wada, R., Fujita, Y., & Kitabatake, N. (2006). Effects of heating at neutral and acid pH on the structure of β-lactoglobulin A revealed by differential scanning calorimetry and circular dichroism spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1760*, 841-847.

Wang, Q. (2007). Application of low-intensity ultrasound to characterise the microestructure of model food systems. vol. PhD Thesis. Germany: Technischen Universität München.

Ziegler, G. R., & Foegeding, E. A. (1990). The gelation of proteins. *Advances in Food and Nutrition Research*, *34*, 203-298.

SECCIÓN I

Capítulo 3

Interacciones entre β–lg y CMP en interfases

I.3. Interacciones CMP–β–lg en interfases.

En los apartados **I.1.2** y **I.1.3** del **Capítulo 1** de esta sección se mostraron los resultados de las determinaciones de tamaño de partícula y estudios adicionales sobre el CMP solo y los sistemas mixtos CMP:β–lg que contribuyeron a describir las interacciones existentes en dichos sistemas. En esta sección se analizó nuevamente la existencia de dichas interacciones pero en soluciones buffer (Trizma y acetato para los pH 7, y 5 y 4, respectivamente) ya que las propiedades interfaciales fueron estudiadas en este tipo de soluciones.

Las condiciones elegidas para este capítulo fueron las siguientes:

- ✓ *Determinación de tamaño de partícula:* el CMP fue estudiado al 0,5 y 4 % p/p a pH 4, 5 y 7. Los sistemas mixtos CMP:β–lg (de Davisco) 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 y 100:0 fueron estudiados a una concentración total del 4 % p/p a pH 7.
- ✓ *Hidrofobicidad superficial:* Todas las determinaciones se realizaron a una concentración total de proteína de 0,4 % p/p.
- ✓ *Propiedades interfaciales:* Se midió la tensión superficial del CMP en soluciones de concentraciones entre 10^{-6} y 10 % p/p a pH 4, 5 y 7. Y luego, con el objetivo de estudiar la interacción CMP:β–lg en la interfase aire–agua, se determinó la tensión superficial de mezclas de ambos cuya relación CMP:β–lg fue: 25:75, 50:50 y 75:25 a una concentración total de proteína del 4 % p/p a pH 7.

I.3.1. Comportamiento interfacial de CMP a diferentes pH.

I.3.1.1. Tamaño promedio y distribución de tamaño de partícula de CMP en soluciones acuosas.

La distribución de tamaño de partícula por intensidad de soluciones de CMP (4 % p/p, pH 4, 5 y 7) después de 24 h de preparadas fue multimodal (**Figura I.3.1A**). El valor máximo del pico predominante de menor tamaño fue 3,7, 4,2 y 4,8 nm a pH 7, 5 y 4, respectivamente y correspondió a estados oligoméricos (por ejemplo, dímeros, trímeros y tetrámeros) del CMP según la estimación del peso molecular realizada con el software del Zetasizer Nano–Zs.

El comportamiento de la solución de CMP en buffer Trizma pH 7 es diferente al comportamiento en agua a pH 7 (**Figura I.1.18** del **Capítulo 1** de esta sección). Esto se puede

explicar por la presencia de iones, en la solución buffer Trizma, que apantallarían las cargas permitiendo la formación de estructuras asociadas como dímeros.

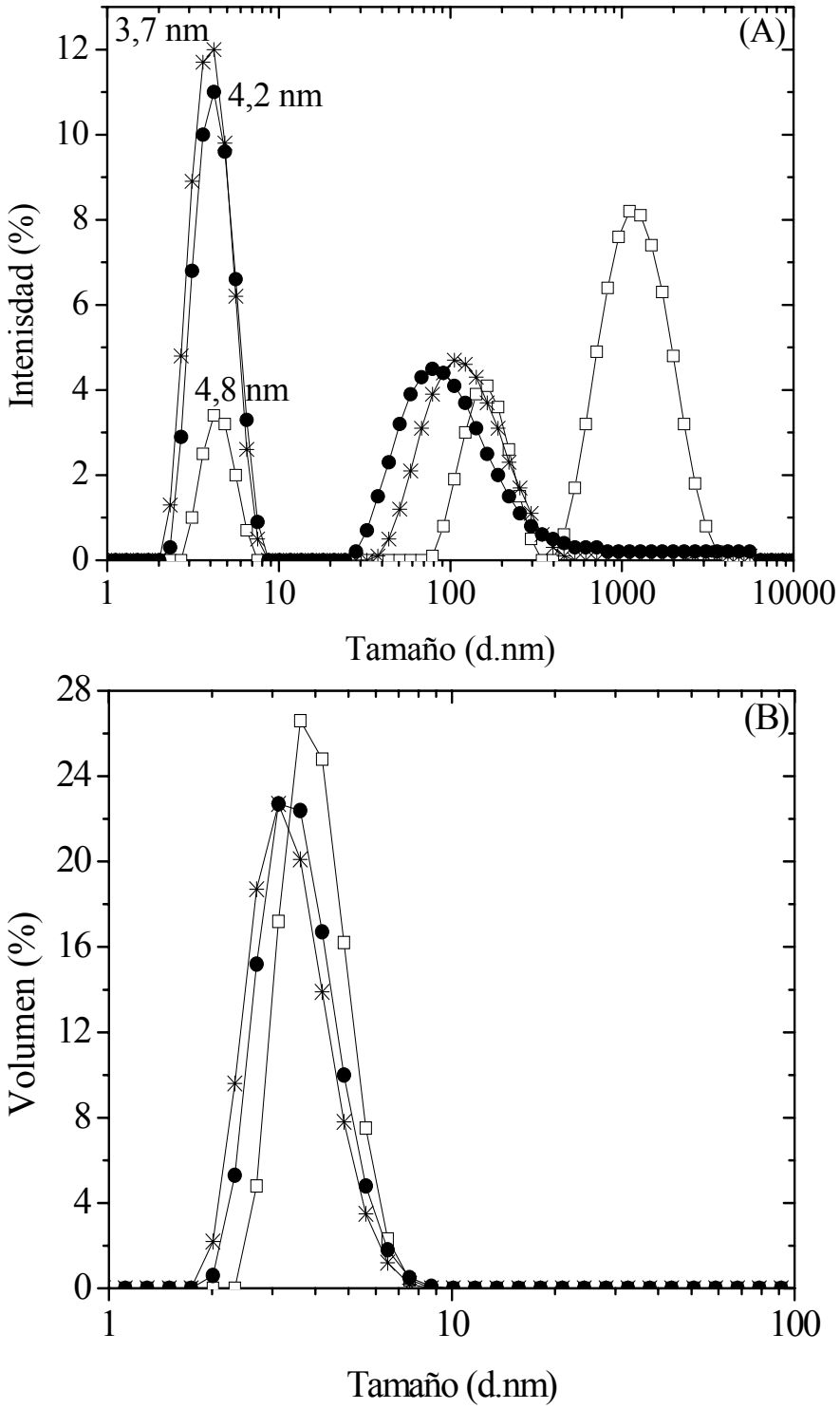


Figura I.3.1. Distribución de tamaño de partícula por (A) intensidad y (B) volumen de soluciones de CMP (4 % p/p) después de 24 h de preparada a pH: (□) 4, (●) 5 y (✳) 7.
Temperatura 25 ºC, I = 0,05 M.

Como fue mencionado en el apartado **I.1.2** del **Capítulo 1**, existen referencias sobre la presencia de formas asociadas de CMP de diferentes tamaños, aunque no existe un acuerdo con respecto al tamaño de los mismos *(Chu, Macleod & Ozimek, 1996; Kawasaki, Kawakami, Tanimoto, Dosako, Tomizawa & Kotake, 1993; Mikkelsen et al., 2005)*. En el capítulo antes mencionado se observó que el CMP en ciertas condiciones forma un dímero, mediante interacción hidrofóbica, que es resistente a cambios de pH.

En las soluciones estudiadas en este capítulo también se observaron estructuras asociadas de aproximadamente 100 nm y sólo a pH 4 se observaron tamaños mayores (cercanos a 1000 nm). Sin embargo, al analizar la distribución de tamaño por volumen se puede ver que el número de estos agregados de gran tamaño es despreciable (**Figura I.3.1B**).

La influencia del pH fue más evidente cuando se analizaron los resultados por el método de cumulantes (**Figura I.3.2**) donde se observa un gran aumento del *d(H)* promedio a pH 4, debido a que se encuentra en la zona isoeléctrica del CMP.

Este gran aumento del *d(H)* promedio está dado por la presencia de poblaciones en tamaños mayores en la distribución de tamaño de partícula por intensidad (**Figura I.3.1A**) a dicho pH.

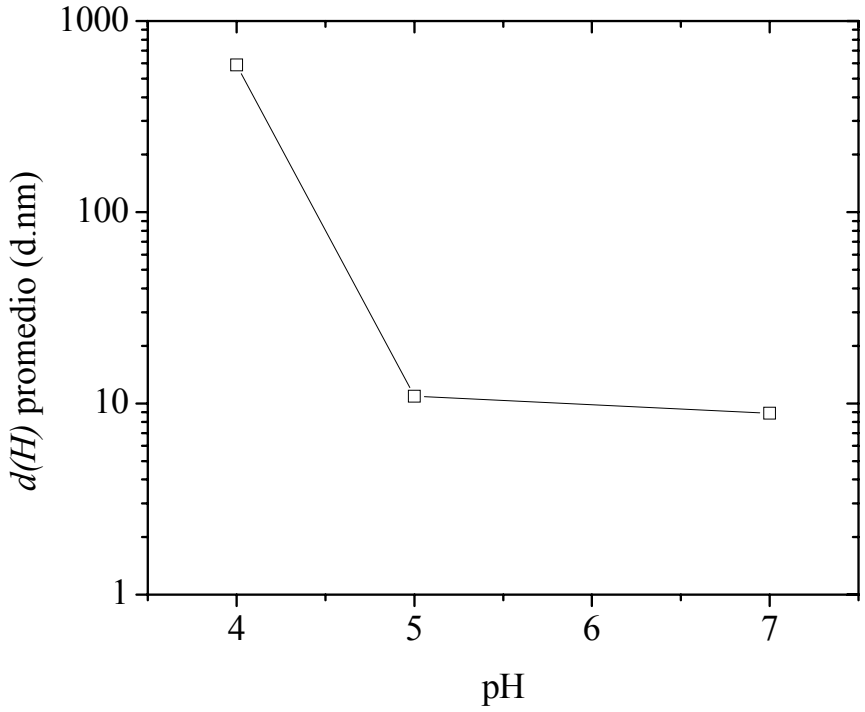


Figura I.3.2. *d(H)* promedio en función del pH de soluciones de CMP (4 % p/p) después de 24 h de preparadas. Temperatura 25 ºC, I = 0,05 M.

Se ha mostrado previamente que el CMP presenta una asociación dependiente del tiempo a pH 4 que se refleja en un aumento exponencial del *d(H)* promedio. En la **Figura I.3.3** se muestra el cambio del *d(H)* promedio en el tiempo a pH 4 a dos concentraciones. Al 4 % p/p, después de 20 h, el *d(H)* promedio fue 546 nm. En cambio, a bajas concentraciones (0,5 % p/p) el aumento fue más lento y alcanzó un valor de 85 nm luego de transcurridas 24 h.

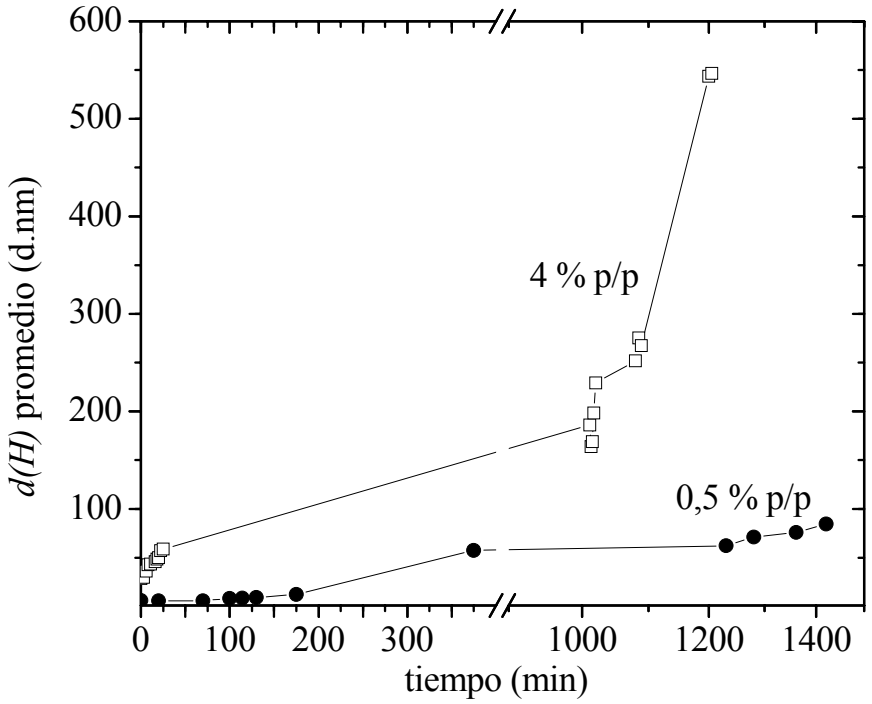


Figura I.3.3. *d(H)* promedio en función del tiempo para soluciones de CMP (% p/p): (□) 4 y (●) 0,5 a pH 4 inmediatamente después de su preparación. Temperatura 25 ºC, I = 0,05 M.

I.3.1.2. Isoterma de adsorción del CMP en la interfase aire–agua.

En la **Figura I.3.4** se muestran las isotermas de adsorción (π vs concentración en la subfase) para CMP a pH 4, 5 y 7. En las proteínas no es posible observar un equilibrio real de adsorción, por lo tanto se asume el valor de pseudo equilibrio cuando la presión superficial medida después de 24 h no cambia por más de 0,1 mN/m comparándolos con los valores a 48 h *(Benjamins, 2000; Rodríguez Niño & Rodríguez Patino, 1998a)*.

Las isotermas de presión superficial mostraron un comportamiento sigmoideo, típico de biopolímeros y surfactantes *(Álvarez Gómez & Rodríguez Patino, 2006; Pérez, Carrera*

Sanchez, Rodríguez Patino & Pilosof, 2006; Pérez, Carrera Sánchez, Rodríguez Patino & Pilosof, 2007; Rodríguez Patino, Carrera Sánchez & Rodríguez Niño, 2008). A los tres pH estudiados, el CMP mostró actividad superficial desde una concentración de 1 x 10^{-6} % p/p; el mayor valor a esta concentración se observó a pH 4 (11 mN/m). La presión superficial aumentó con la concentración de proteína, pero para la solución a pH 7 este incremento fue más notable a partir de una concentración de 1 x 10^{-4} % p/p.

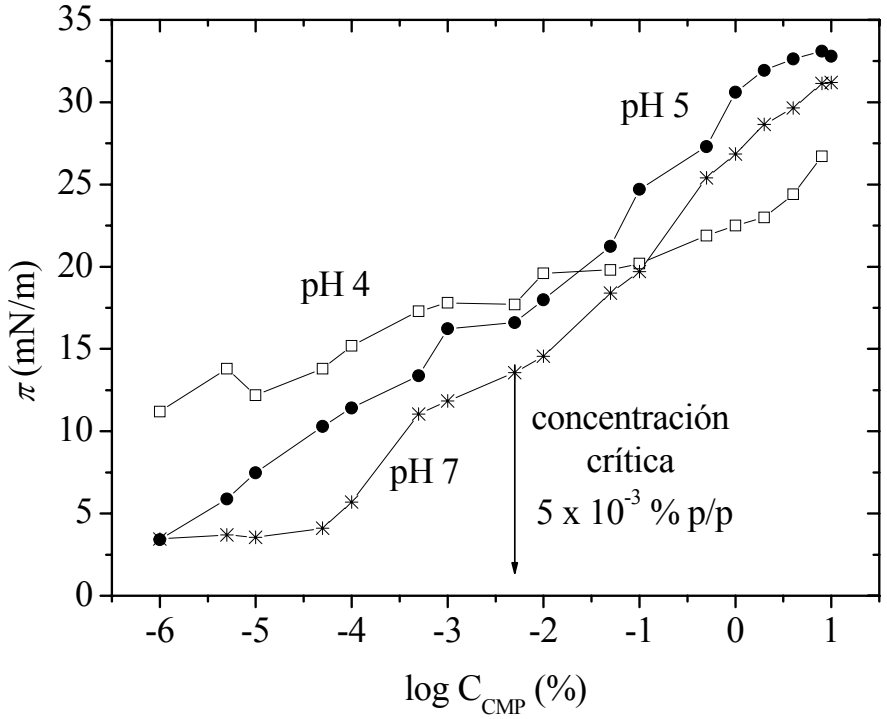


Figura I.3.4. Isotermas de adsorción para CMP a pH: (□) 4, (●) 5 y (✳) 7.
Temperatura 20 ºC, *I* = 0,05 M.

En la **Figura I.3.4** se observa que a una concentración crítica de CMP de alrededor de 5 x 10^{-3} % p/p se observó un punto de inflexión en todas las isotermas. El punto de inflexión en las isotermas π–*C* se relaciona con la transición de una estructura expandida a una más condensada *(Graham & Philips, 1979; Pérez et al., 2006)*. Así, teniendo en cuenta el comportamiento de las películas proteicas interfaciales *(Graham & Philips, 1979)*, a presiones superficiales menores que 12,5, 16,6 y 17,7 mN/m para pH 7, 5 y 4 respectivamente, el CMP adoptaría una estructura expandida (*estructura I*). De acuerdo a la bibliografía, a pH 7 la β–lg, α–la y BSA presentan valores parecidos de presión superficial crítica *(Baeza, Carrera Sánchez, Pilosof & Rodríguez Patino, 2004; Cornec, Dennis & Narsimhan, 2001; Guzey,*

McClements & Weiss, 2003; Rodríguez Niño & Rodríguez Patino, 2002). Por otro lado, también se ha comprobado que la transición en las caseínas, por ejemplo β–caseína, se produce a 10,5 mN/m a pH 7 *(Rodríguez Patino, Carrera Sánchez & Rodríguez Niño, 1999a)*. Por lo tanto, la presencia de algún residuo de β–lg y α–la en la preparación de CMP, como la que fue observada en la electroforesis SDS–PAGE (**Figura I.1.17**), podría contribuir a la transición observada a los 12,5 mN/m a dicho pH. Por encima de la concentración crítica (5 x 10^{-3} % p/p) el CMP adoptaría una conformación más condensada (*estructura II*) a los tres pH evaluados. La saturación de la monocapa no se alcanzó aún a concentraciones de solución del 10 % p/p, lo cual es observado por la ausencia de un "plateau", típicamente presente en isotermas de otras proteínas *(Álvarez Gómez & Rodríguez Patino, 2006; Pérez et al., 2007)*.
A pH 5 se obtuvieron mayores valores de presión superficial que a pH 7 en todo el rango de concentración estudiado (**Figura I.3.4**). A concentraciones de CMP menores que la concentración crítica (5 x 10^{-3} % p/p) la actividad superficial del CMP aumentó con la disminución del pH hasta 4. Este comportamiento se explica por una reducción de la repulsión electroestática entre las moléculas a pH 4, valor que se encuentra en la zona isoeléctrica *(Kreuß, Krause & Kulozik, 2008; Silva-Hernández, Nakano & Ozimek, 2002)*, lo cual permite que más moléculas sean adsorbidas a la interfase. Además, la barrera de energía que impide la adsorción interfacial y el esparcimiento es mínimo en este punto *(Poole & Fry, 1987)*. Por encima de la concentración crítica, a pH 4, se observó una disminución muy importante de la presión superficial respecto a los pH 5 y 7 debido al predominio de la asociación del CMP en la solución observable a más altas concentraciones (**Figuras I.3.2** y **I.3.3**).

Como se dijo anteriormente, el peso molecular medio del CMP es aproximadamente 7,5 kDa; algunas formas de CMP no glicosilados presentan pesos moleculares de 6,7 kDa y las formas glicosiladas presentan pesos moleculares de alrededor de 9,6 kDa, dependiendo del grado y tipo de glicosilación y de las variantes genéticas *(Mollé & Leonil, 2005)*. El peso molecular de la β–lg es mucho mayor que el del CMP (18,4 kDa) *(Burova, Grinberg, Visschers, Grinberg & de Kruif, 2002; McGuffey, Otter, van Zanten & Foegeding, 2007)*, y esta proteína alcanza el plateau a una concentración del 1 % p/p *(Álvarez Gómez & Rodríguez Patino, 2006)*. Tanto el menor tamaño del CMP, como su conformación flexible y de random coil, favorecerían la penetración en la interfase de una mayor cantidad de proteína antes que se produjera la saturación de la película interfacial. Además, el CMP es un péptido desordenado y flexible

(Walstra, 1990), a diferencia de la β–lg, que es una proteína globular con una estructura más compacta que experimenta grandes cambios conformacionales en la interfase.

Debido a la inexistencia de datos en la literatura acerca de la presión superficial del CMP, resulta interesante comparar la actividad superficial del CMP con la de otras proteínas lácteas. La **Tabla I.3.1** muestra que a bajas concentraciones (10^{-3} % p/p), la presión superficial de equilibrio del CMP fue más baja que la de otras proteínas lácteas. A una concentración intermedia (0,5 % p/p), la presión superficial del CMP es similar a la de otras proteínas del suero lácteo. Sin embargo, a altas concentraciones (2 % p/p) la presión superficial de equilibrio del CMP tiende a ser más alta que la de otras proteínas del suero (por ejemplo, la β–lg).

Tabla I.3.1. Presión superficial de equilibrio en la interfase aire–agua para proteínas lácteas a pH 7 y 20 °C.

Proteína	Concentración (% p/p)	π_{eq} (mN/m)	Referencias
CMP	**5 x 10^{-3}**	**13**	**de este trabajo**
β–lg (> 95%)	5 x 10^{-3}	18	*Álvarez Gómez et al. (2006)*
WPC (80%)	5 x 10^{-3}	22	*Pérez et al. (2007)*
BSA	5 x 10^{-3}	19	*Rodríguez Niño & Rodríguez Patino (1998b)*
	5 x 10^{-3}	17,5	*Graham & Philips (1979)*
	5 x 10^{-3}	17,3	*Kim & Kinsella (1985)*
β–caseína	5 x 10^{-3}	21,25	*Graham et al. (1979)*
	1 x 10^{-3}	21,5	*Galazka & Dickinson (1995)*
α–caseína	1 x 10^{-3}	20	*Galazka et al. (1995)*
κ–caseína	1 x 10^{-3}	21,7	*Galazka et al. (1995)*
caseinato de sodio	1 x 10^{-3}	21,8	*Galazka et al. (1995)*
CMP	**0,5**	**25,4**	**de este trabajo**
β–lg (> 95%)	0,5	25	*Álvarez Gómez et al. (2006)*
WPC (80%)	0,5	27	*Pérez et al. (2007)*
BSA	0,5	20,7	*Rodríguez Niño et al. (1998b)*
	0,5	23,3	*Kitabatake & Doi (1988)*
CMP	**2**	**28,6**	**de este trabajo**
β–lg (> 95%)	2	26,8	*Pérez et al. (2007)*

I.3.1.3. Dinámica de adsorción.

En la **Figura I.3.5A** y **B** se muestra la evolución de la presión superficial en el tiempo para el CMP a pH 7 y 5 respectivamente, en la interfase aire–agua a varias concentraciones en la subfase.

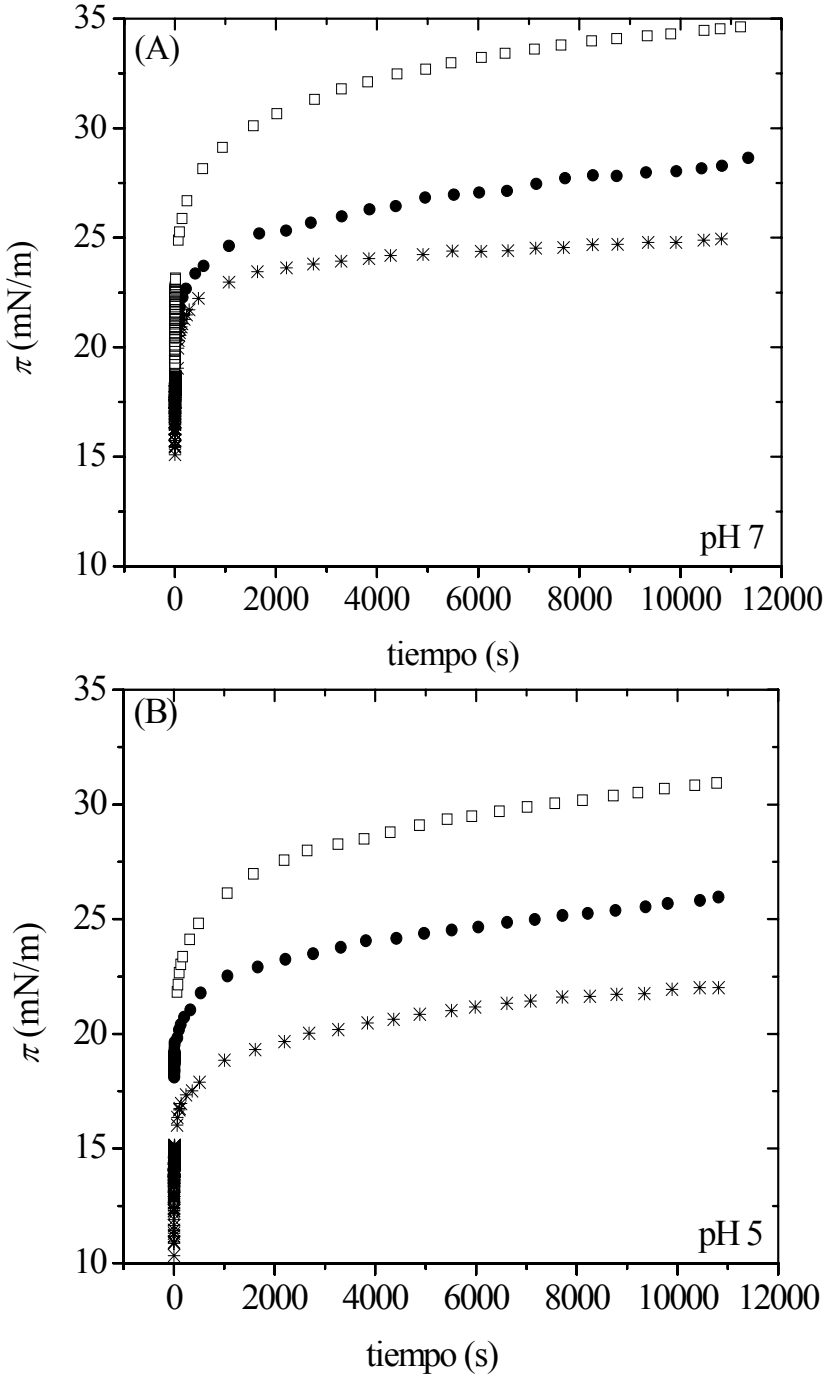


Figura I.3.5. Presión superficial en función del tiempo de adsorción de soluciones de CMP al: (□) 4, (●) 0,5 y (✳) 10^{-2} % p/p a pH (A) 7 y (B) 5. Temperatura 20 ºC, I = 0,05 M.

Debido a la tendencia a la asociación del CMP con el tiempo a pH 4, como se mostró previamente en la **Figura I.3.3**, no se estudió la dinámica de adsorción a ese pH.
El aumento en la presión superficial con el tiempo se asocia con la adsorción de la proteína en la interfase aire–agua *(Damodaran & Song, 1988; Graham & Phillips, 1979b; MacRitchie & Alexander, 1963)*. La presión superficial a cada concentración a pH 7 (**Figura I.3.5A**) fue mayor que a pH 5 (**Figura I.3.5B**), lo cual se puede atribuir al menor *d(H)* promedio observado a pH 7 para la solución de CMP al 4 % p/p (8,9 nm respecto de 10,9 nm observado a pH 5) lo que permitiría una más rápida migración del CMP a la interfase aire–agua a pH 7 que a pH 5. Sin embargo, en el equilibrio, el CMP a pH 5 mostró mayor presión superficial que a pH 7 (**Figura I.3.4**) como resultado de una menor repulsión electrostática a medida que el pH se aproxima al pI.

La presión superficial es función tanto de la concentración como de la conformación de las proteínas en la interfase aire–agua. En la **Figura I.3.4** ya se mostró el efecto de la concentración, donde se obtuvo mayor presión superficial a mayores concentraciones. Por otro lado, si el pH del medio es diferente al del punto isoeléctrico de la proteína, la molécula proteica presenta una carga neta y en consecuencia la presión superficial puede verse afectada por dos fenómenos opuestos: (i) la adsorción de la proteína en la interfase aire–agua aporta carga a la interfase, así se forma una doble capa eléctrica en la vecindad de la interfase la cual disminuye la velocidad de adsorción por medio de repulsiones electroestáticas intermoleculares *(Narsimhan & Uraizee, 1992)*; (ii) luego ocurre un aumento de la presión superficial, debido a repulsiones intramoleculares las cuales despliegan las moléculas a la interfase y permiten que se reordenen lo que puede llevar varias horas *(Graham & Phillips, 1979a)*. Por lo tanto, la velocidad de cambio de la presión superficial depende en primera instancia de la velocidad de adsorción. Sin embargo, cuando las proteínas llegan al equilibrio, el segundo efecto mencionado junto con otros efectos termodinámicamente favorables (por ejemplo, las interacciones hidrofóbicas) desplazan parcialmente el primer efecto, es por eso que la presión superficial en el equilibrio no puede ser comparada con la presión superficial a cortos tiempos de adsorción.

En general, a bajas concentraciones superficiales, la presión superficial es baja y las moléculas se adsorben de forma irreversible por difusión. En el caso de adsorción controlada

por la etapa de difusión, en ausencia de convección, la difusión está gobernada por un gradiente de concentración *(MacRitchie, 1990)*. Por lo tanto, durante la primera etapa, a valores bajos de presión superficial, cuando la difusión es la etapa controlante, se puede utilizar la forma modificada de la ecuación de Ward y Tordai (**ecuación 9**).

La **Figura I.3.6** muestra la aplicación de dicha ecuación durante la primera etapa de adsorción del CMP.

El gráfico π–tiempo$^{1/2}$ muestra que la etapa de difusión es demasiado rápida (π > 10 mN/m al inicio de la medición) en todas las concentraciones estudiadas, como para ser detectadas por esta técnica.

Esta difusión tan rápida es característica de surfactantes de bajo peso molecular *(Álvarez Gómez & Rodríguez Patino, 2006; Nawar, 1985)*. Por lo tanto, se puede decir que en estas condiciones, la etapa de difusión no influye en la cinética de adsorción del CMP a la interfase aire–agua. Sin embargo, se puede obtener una estimación de la constante de velocidad de difusión (K_{dif}) a partir de la pendiente del primer punto de la **Figura I.3.6**.

En la **Tabla I.3.2** se muestran estos valores y se puede observar un incremento en K_{dif} con el aumento de la concentración desde 10^{-2} a 4 % p/p a ambos pH.

Tabla I.3.2. Constante de velocidad de difusión (K_{dif}) para soluciones de CMP a 20 °C.

	Concentración (% p/p)	**K_{dif} (mN m^{-1} s$^{-0.5}$)**
pH 7	4	> 76,72
	0,5	> 74,24
	10^{-2}	> 60,36
pH 5	4	> 72,92
	0,5	> 70,40
	10^{-2}	> 41,32

Luego del período de difusión del CMP a la interfase, la penetración, el despliegue y el reordenamiento de este polipéptido a la interfase controlan la velocidad de adsorción. Para analizar la velocidad de esta etapa de adsorción (penetración) y reordenamiento de la proteína en la interfase aire–agua, se utilizó la ecuación propuesta por *Graham & Phillips (1979b)* y *Tornberg (1978)* (**ecuación 10**) obteniéndose dos o más regiones lineales. La primera

pendiente se corresponde con la constante cinética de primer orden de adsorción/penetración (K_{ads}), mientras que la segunda pendiente se corresponde con la constante cinética de primer orden de reordenamiento (K_r) de las moléculas de proteína adsorbidas en la interfase aire–agua *(Graham & Philips, 1979; Suttiprasit, Krisdhasima & McGuire, 1992; Tornberg, 1978)*.

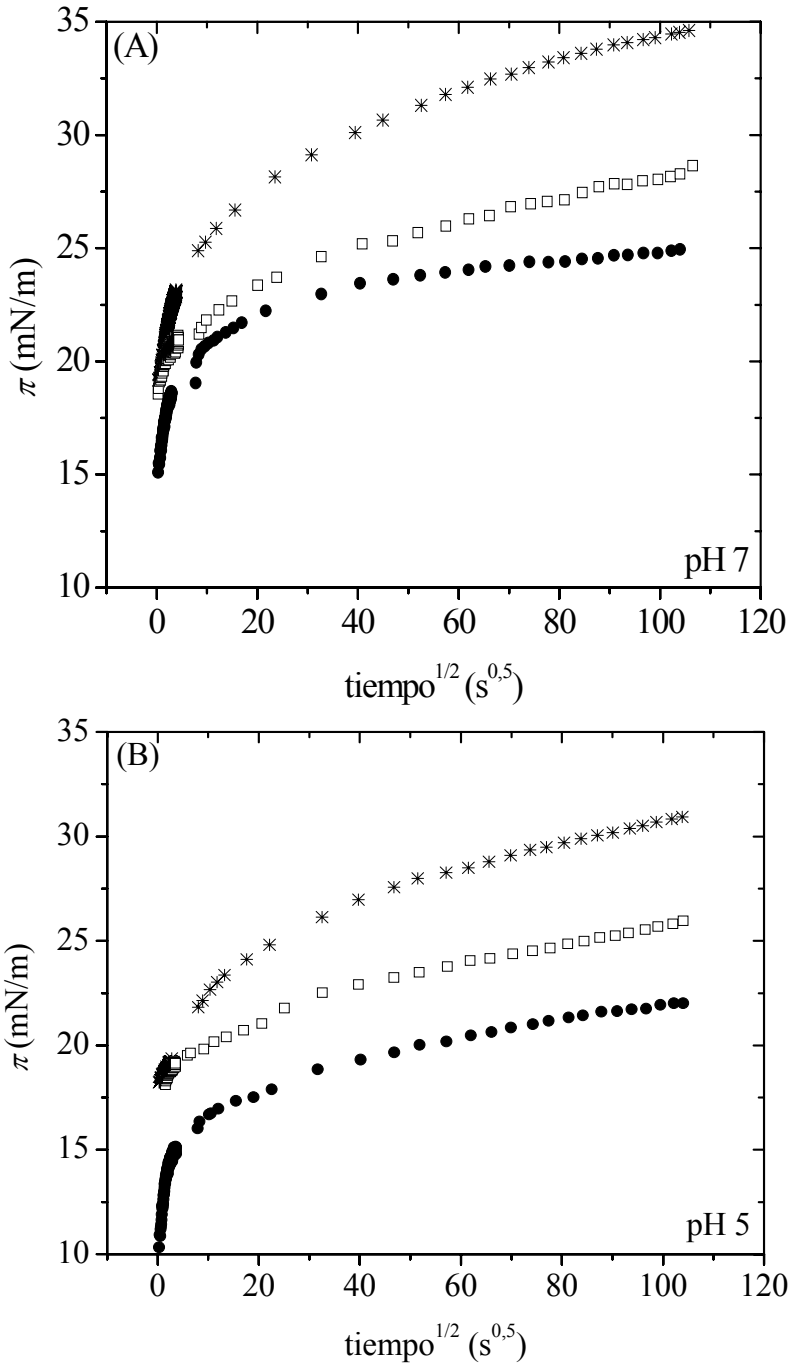


Figura I.3.6. Dependencia de la presión superficial con el tiempo de películas de CMP adsorbidas a la interfase aire–agua de acuerdo a la velocidad de difusión a pH: (A) 7 y (B) 5. Concentraciones de CMP en solución (% p/p): (□) 4, (●) 0,5 y (✳) 10^{-2}. Temperatura 20 ºC, I = 0,05 M.

El ajuste de los datos experimentales para obtener la K_{ads} se realizó a intervalos de tiempo basados en el mejor coeficiente de regresión lineal, teniendo en cuenta que estos intervalos no sean afectados por la difusión. En la **Figura I.3.7** se puede observar el ajuste de los datos experimentales a la **ecuación 10** en todas las concentraciones y pH estudiados.

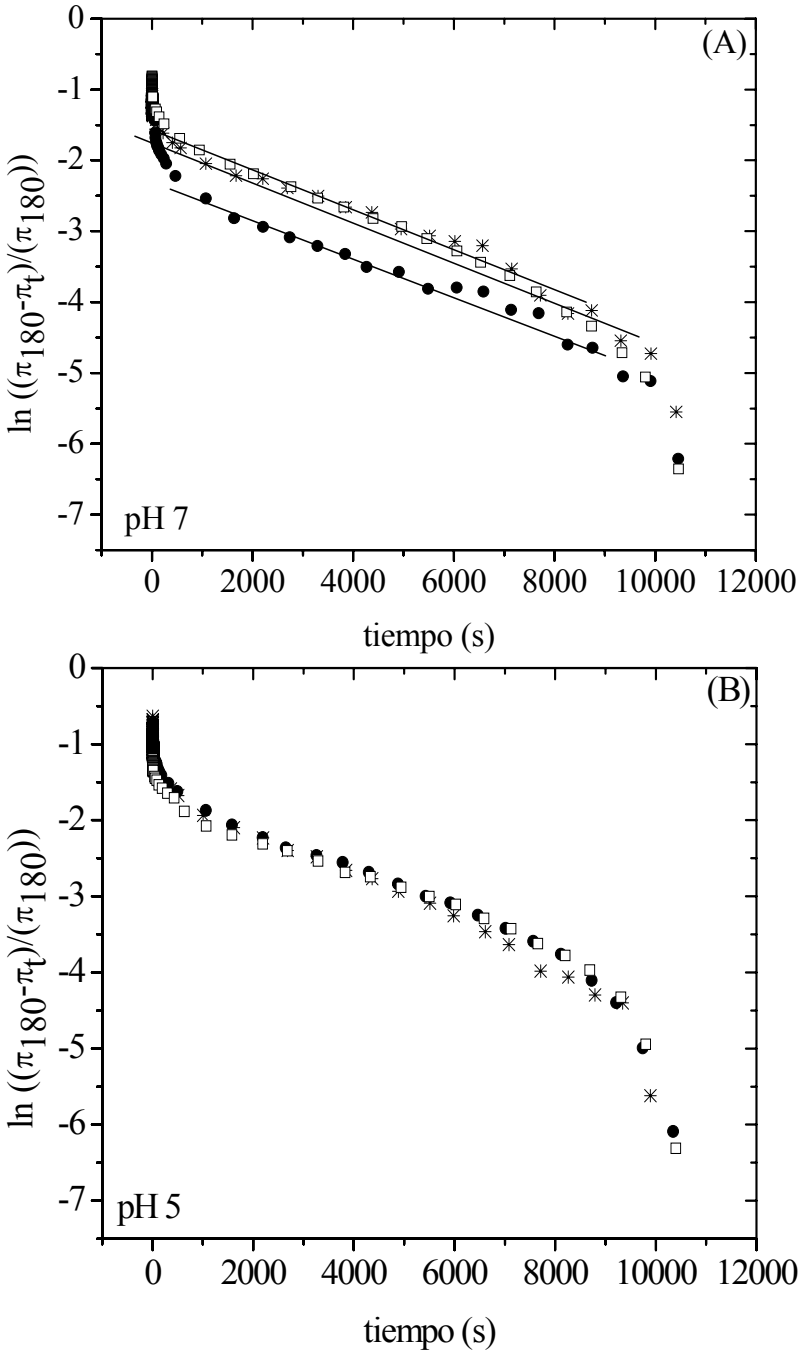


Figura I.3.7. Dependencia de la presión superficial con el tiempo de películas de CMP adsorbidas de acuerdo a la velocidad de adsorción, despliegue y penetración a la interfase aire–agua a pH: (A) 7 y (B) 5. Concentración de CMP en solución (% p/p): (□) 4, (●) 0,5 y (✳) 10^{-2}.
Temperatura 20 ºC, I = 0,05 M.

En la **Figura I.3.8A** y **B** se grafican los valores de las constantes obtenidas a partir de regresiones lineales realizadas a los datos de la **Figura I.3.7**.

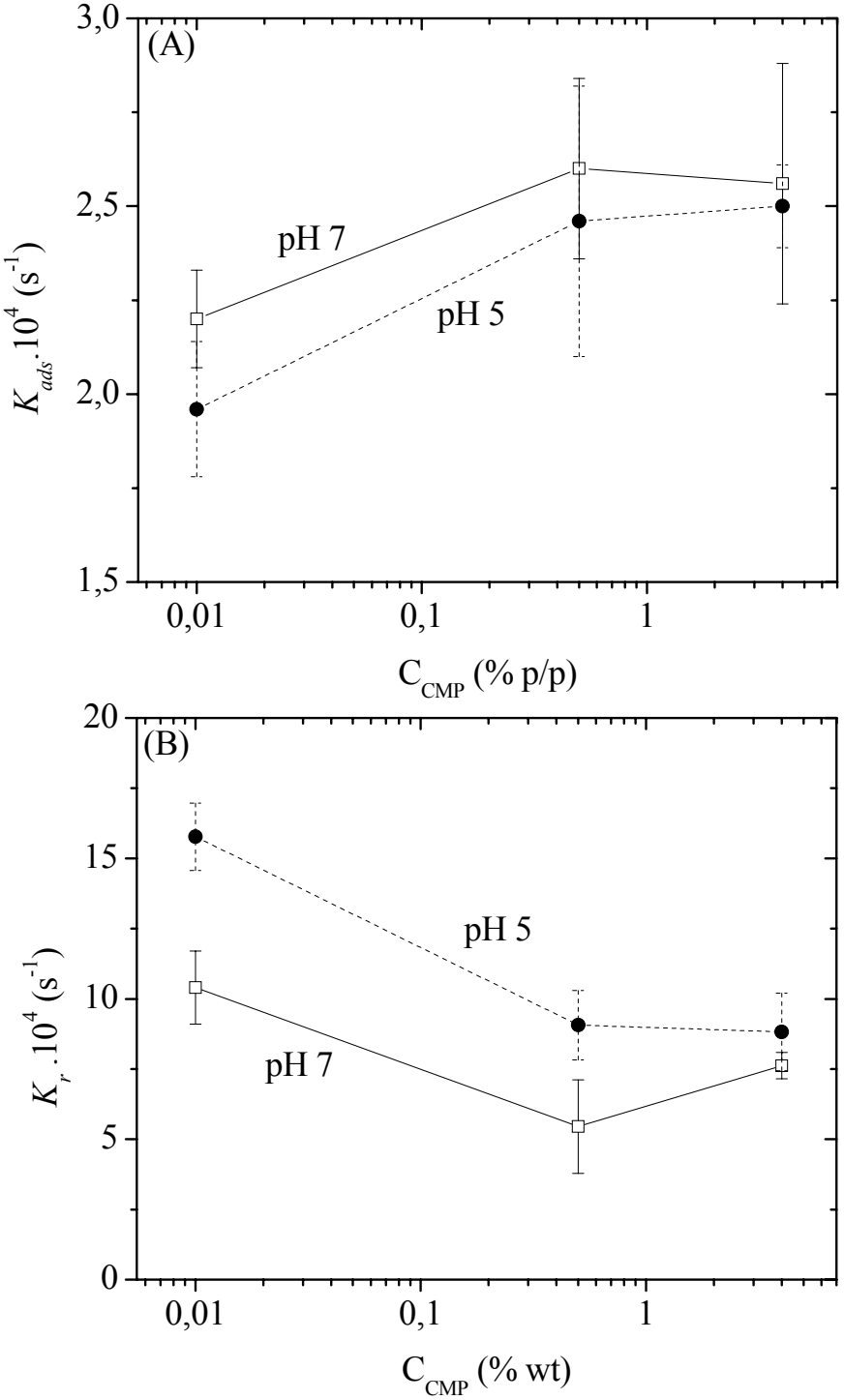


Figura I.3.8. Constante de velocidad de (A) adsorción y (B) reordenamiento en la interfase aire–agua en función de la concentración de CMP a pH (□) 7 y (●) 5. Temperatura 20 ºC, I = 0,05 M.

Se observa que las constantes de velocidad de adsorción y reordenamiento fueron similares para las concentraciones de CMP más altas. Sin embargo, a las concentraciones menores de CMP (10^{-2} % p/p) la constante de velocidad de adsorción/penetración (K_{ads}) disminuyó a ambos pH (**Figura I.3.8A**).

De hecho, la adsorción y penetración de una proteína a la interfase aire–agua se facilita a mayores concentraciones de proteína en solución *(Rodríguez Niño, Carrera Sánchez, Ruíz-Henestrosa & Patino, 2005)*. Por otro lado, la constante de velocidad de reordenamiento (K_r) disminuyó con el aumento de la concentración (**Figura I.3.8B**) lo cual puede deberse a la existencia de restricción estérica por la mayor carga en la interfase. La velocidad de reordenamiento (K_r) fue mayor a pH 5 debido a la disminución de la repulsión electrostática por tratarse de un valor cercano al pI del CMP.

I.3.14. Propiedades viscoelásticas de películas de CMP.

La **Figura I.3.9** muestra un ejemplo de la evolución del módulo dilatacional de las películas, de las componentes elástica y viscosa y de la tangente del ángulo de fase con el tiempo.

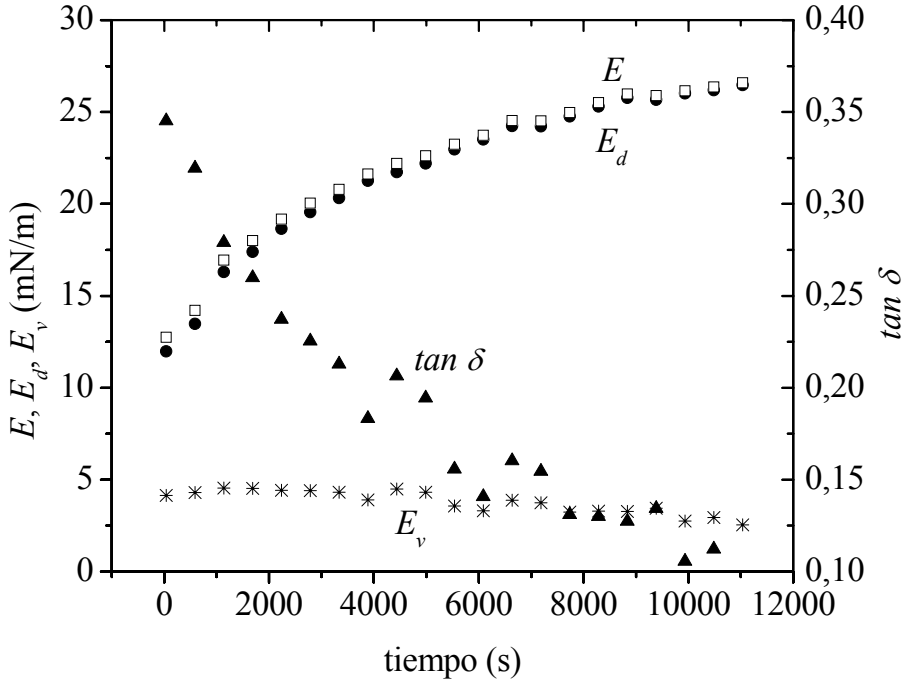


Figure I.3.9. Dependencia con el tiempo de (□): módulo dilatacional superficial, E, (●): elasticidad dilatacional superficial, E_d, (✳): viscosidad dilatacional superficial, E_v, y (▲): tangente del ángulo de fase, *tan* δ, para películas de CMP adsorbidas a la interfase aire–agua a pH 7. Concentración de CMP: 4 % p/p. Frecuencia 100 mHz. Amplitud de deformación: 10 %. Temperatura 20 °C, y I = 0,05 M.

La elasticidad dilatacional y el módulo dilatacional fueron muy similares lo que indica el comportamiento elástico de las películas de CMP. Ambos módulos aumentaron su valor con el tiempo a medida que el CMP se adsorbía. El módulo viscoso disminuyó muy levemente con el tiempo, mientras que la *tan δ* mostró una gran disminución con el tiempo de adsorción.

En la **Tabla I.3.3** se pone en evidencia el efecto del pH y la concentración sobre los valores de elasticidad dilatacional superficial del CMP a 180 min de adsorción (E_{d180}). Los valores de E_{d180} fueron significativamente más altos para la menor concentración de CMP en solución (10^{-2} % p/p).

Tabla I.3.3. Efecto del pH y de la concentración de CMP sobre la elasticidad dilatacional superficial a 180 min de adsorción (E_{d180}) a 20 °C.

E_{d180} (mN/m)			
	Concentración de CMP (% p/p)		
	4	**0,5**	**10^{-2}**
pH 7	26,46 ± 0,82	25,51 ± 0,84	33,38 ± 1,04
pH 5	26,67 ± 0,91	25,45 ± 0,63	28,82 ± 0,97

A pH 5 el valor de E_{d180}, para la menor concentración de CMP (10^{-2} % p/p), fue menor que a pH 7, mientras que a las otras concentraciones los valores fueron similares. Este comportamiento tan complejo puede deberse a la existencia de interacciones proteína–proteína que dependen de la concentración de CMP, del pH y de las velocidades de difusión, adsorción y reordenamiento del CMP en la interfase aire–agua.

A la menor concentración en el seno de la solución, la interfase se encuentra menos ocupada y las moléculas de CMP pueden reordenarse más fácilmente (> K_r) e interactuar más eficientemente para generar una película más elástica. Esta tendencia se ha observado tanto en otras proteínas como en polisacáridos *(Rodríguez Patino & Rodríguez Niño, 1995; Rodríguez Patino, Rodríguez Niño, Carrera Sánchez, Navarro García, Rodríguez Rodríguez Mateos & Cejudo Fernández, 2001)*.

En la **Tabla I.3.4** se compara la elasticidad dilatacional superficial a 180 min de tiempo de adsorción (E_{d180}) del CMP con la de otras proteínas del suero.

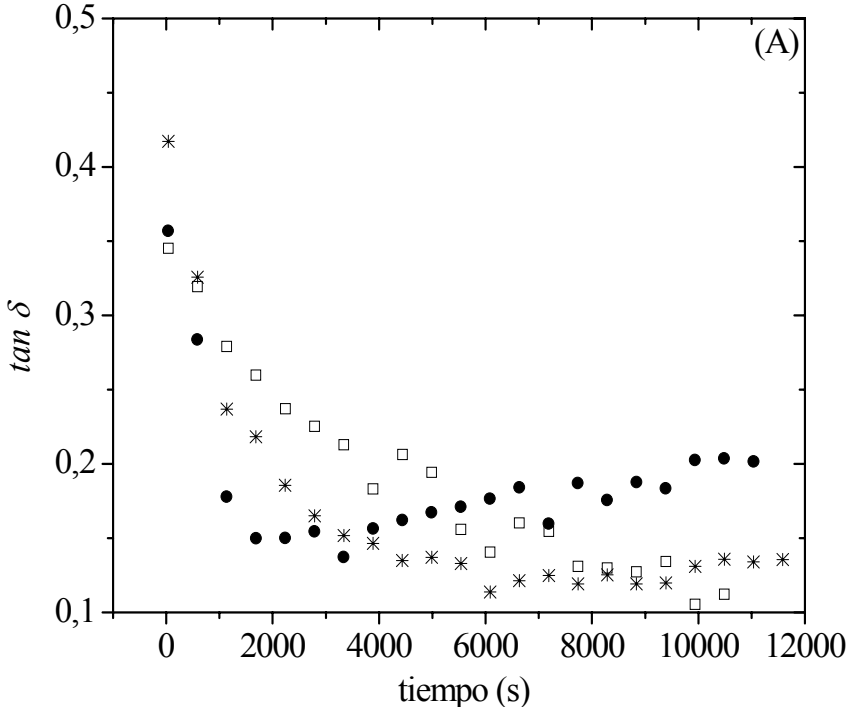
Tabla I.3.4. Elasticidad dilatacional superficial de proteínas del suero lácteo a los 180 min de tiempo de adsorción (E_{d180}) a pH 7 y 20 °C.

E_{d180} (mN/m)					
	Concentración de proteína (% p/p)				
	4	**1**	**0,5**	**10^{-2}**	**10^{-4}**
CMP[a]	26,5	–	25,5	33,4	–
WPC[b]	–	52	–	27,5	32,5
β–lg[c]	–	37,5	–	25	30

[a]: de este trabajo, [b]: *Pérez (2005)*, [c]: *Álvarez Gómez & Rodríguez Patino (2007)*.

El comportamiento de este parámetro varía con la concentración de proteína. A concentraciones altas (≥ 1 % p/p) los valores de E_{d180} de las películas de CMP fueron más bajos que las de WPC y β–lg, pero a concentraciones menores (10^{-2} % p/p) los valores de E_{d180} de las películas de CMP fueron levemente superiores que las de películas de otras proteínas del suero.

La evolución de *tan δ* (viscoelasticidad relativa) con el tiempo de películas de CMP (**Figura I.3.10**) mostró que la *tan δ* disminuyó con el tiempo de adsorción indicando la formación de una película viscoelástica estructurada.



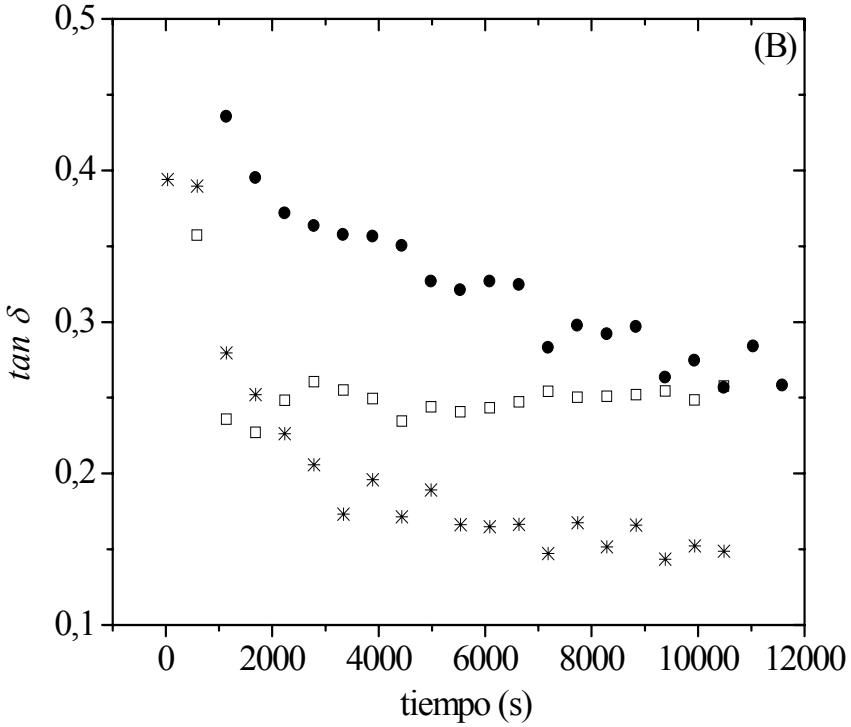


Figura I.3.10. Dependencia de *tan δ* con el tiempo para soluciones de CMP adsorbidas a la interfase aire–agua a pH (A) 7 y (B) 5. Concentración de CMP en solución (% p/p): (□) 4, (●) 0,5 y (✳) 10^{-2}. Frecuencia 100 mHz. Amplitud de deformación: 10 %. Temperatura 20 °C, y I = 0,05 M.

A pH 7 (**Figura I.3.10A**), la concentración de CMP afectó muy levemente la viscoelasticidad, mientras que a pH 5 (**Figura I.3.10B**) la viscoelasticidad de las películas fue mayor a las concentraciones más bajas de CMP (por ejemplo, 10^{-2} % p/p). No obstante, la viscoelasticidad relativa fue mayor (menor *tan δ*) a pH 7 a las tres concentraciones estudiadas.

La **Figura I.3.11** muestra una curva maestra del módulo dilatacional E en función de π para películas de CMP adsorbidas a diferentes tiempos a la interfase aire–agua a pH 5 y 7 con diferentes concentraciones de CMP. Si el módulo dilatacional superficial (E) fuera sólo debido a la cantidad de macromoléculas adsorbidas a la interfase aire–agua, todos los datos E deberían normalizarse en esta curva. Esta normalización fue posible para CMP a pH 5 pero no para pH 7.

El aumento de E con π refleja la cantidad de proteína adsorbida a la interfase y/o el grado de interacciones macromoleculares.

Los resultados observados en la **Figura I.3.11** sugieren que el CMP a pH 7 se adsorbe a la interfase aire–agua con distintos grados de asociación dependiendo de la concentración de la

solución lo que se ve reflejado en un aumento del valor *E* con la disminución de la concentración de CMP desde 4 a 10^{-2} % p/p. *Rodríguez Patino, Rodríguez Niño, Carrera Sánchez, Molina & Añón (2005) y Rodríguez Patino, Molina Ortiz, Carrera Sánchez, Rodríguez Niño & Añón (2003)* estudiaron el comportamiento de la glicina y la β–conglicinina en la interfase aire–agua a pH 2 y 5 en el primer caso y 8 en el segundo caso y ellos informaron la misma dependencia del módulo dilatacional con la concentración; la disminución en el módulo dilatacional superficial (*E*) con la mayor concentración de proteína en solución la atribuyeron a dos razones posibles: (i) la formación de más residuos de agregados de la proteína en la interfase, y (ii) la consecuencia de la rápida ocupación de la interfase lo cual restringiría el despliegue y reordenamiento superficial. El comportamiento del CMP se puede relacionar con esta segunda razón porque a pH 7 no se agrega (**Figura I.3.1A**), además la velocidad de difusión del CMP fue mayor a las mayores concentraciones (**Tabla I.3.2**) lo que facilitaría esta rápida ocupación de la interfase.

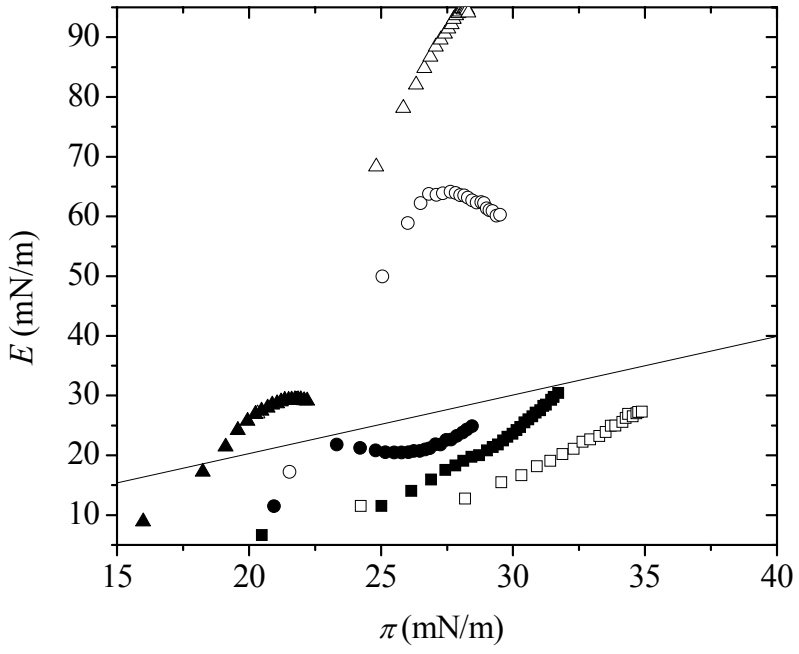


Figura I.3.11. Módulo dilatacional superficial (*E*) en función de la presión superficial (π) para soluciones de CMP adsorbidas a la interfase aire–agua. pH: (símbolos vacíos) 7 y (símbolos llenos) 5. Concentración de CMP en solución (% p/p): (□,■) 4, (○,●) 0,5 y (△,▲) 10^{-2}. La línea corresponde al comportamiento de un gas ideal. Temperatura 20 ºC y I = 0,05 M.

A la mayor concentración de CMP en solución (4 % p/p) a pH 7, el valor de *E* fue muy bajo aún a las más altas presiones superficiales indicando una fuerte reducción en las interacciones del CMP adsorbido.

Para todas las concentraciones estudiadas a pH 5, la pendiente del gráfico *E*–π fue cercana a 1, lo que indica que el CMP adsorbido a este pH exhibe el comportamiento de un gas ideal sugiriendo que a pH 5 existen pocas interacciones entre las moléculas de CMP adsorbido.

Debido a la ausencia de grupos sulfidrilos en el CMP y a su baja hidrofobicidad (como se verá más adelante) las principales fuerzas de interacción en el CMP son de naturaleza electroestática. Así, a pH 5, cercano al valor del pI del CMP, existen pocas interacciones.

Para poder comprender los resultados obtenidos en este apartado respecto al efecto del pH, hay que tener en cuenta el modelo propuesto en el **Capítulo 1** de esta sección (**Figura I.1.26**) donde las moléculas de CMP a pH 6,5 se podían asociar por medio de interacciones hidrofóbicas formando dímeros. Esto explicaría la menor velocidad de difusión del CMP a pH 5 ya que lo dímeros migrarían más lentamente a la interfase que los monómeros presentes a pH 7.

Sin embargo, a pH 5 se observó una mayor velocidad de reordenamiento lo cual puede explicarse por una disminución de la carga neta que posibilita un mayor reacomodo de las moléculas de CMP en la interfase aire–agua.

I.3.2. Interacciones y comportamiento interfacial en mezclas de β–lg y CMP.

I.3.2.1. Tamaño promedio y distribución de tamaño de partícula en soluciones acuosas.

La distribución de tamaño de partícula por intensidad para β–lg al 4 % en buffer Trizma (pH 7) indicó que existe sólo una población de partículas que tienen un tamaño comprendido entre 3 y 15 nm, como se puede observar en la **Figura I.3.12A**. El máximo del pico de la distribución de tamaño a 25 °C fue de 6,5 nm lo cual es consistente con el dímero de β–lg que es la forma predominante a pH neutro como se vio en la **Figura I.1.1** (aunque difiere de lo observado en la **Figura I.1.33** como fue explicado oportunamente en dicha figura). Sin embargo, la población también incluyó monómeros, proteínas minoritarias de tamaño/PM más grandes presentes en la muestra de β–lg y estructuras de β–lg más grandes que dímeros como fue observado también mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en la **Figura 20**.

La distribución de tamaño de partícula por intensidad para el CMP fue bimodal (**Figura I.3.12C**). El valor máximo del pico predominante de menor tamaño fue de 3,7 nm como ya se mostró en la **Figura I.3.1** de este capítulo y correspondió a un estado oligomérico del CMP.
En la electroforesis mostrada en la **Figura I.1.17**, se observó la presencia de tetrámeros a pH 7 además de la de monómeros aunque ambos eran teñidos muy débilmente con Commassie Blue debido a la poca afinidad que presenta dicho colorante con el CMP, como fue explicado en dicha figura.
Kawasaki, Kawakami, Tanimoto, Dosako, Tomizawa & Kotake (1993) y Chu, Macleod & Ozimek (1996) encontraron formas asociadas de CMP de diferentes tamaños teniendo la mayoría de ellos un PM entre 30 y 50 kDa. *Mikkelsen et al. (2005)* propusieron que las estructuras asociadas de CMP consisten de cuatro moléculas de CMP que una vez formadas son resistentes a cambios en el pH. También se observó una población de aproximadamente 100 nm para la muestra de CMP, pero su número fue insignificante como se puede deducir a partir del gráfico de distribución de tamaño de partícula por volumen (**Figura I.3.13C**).

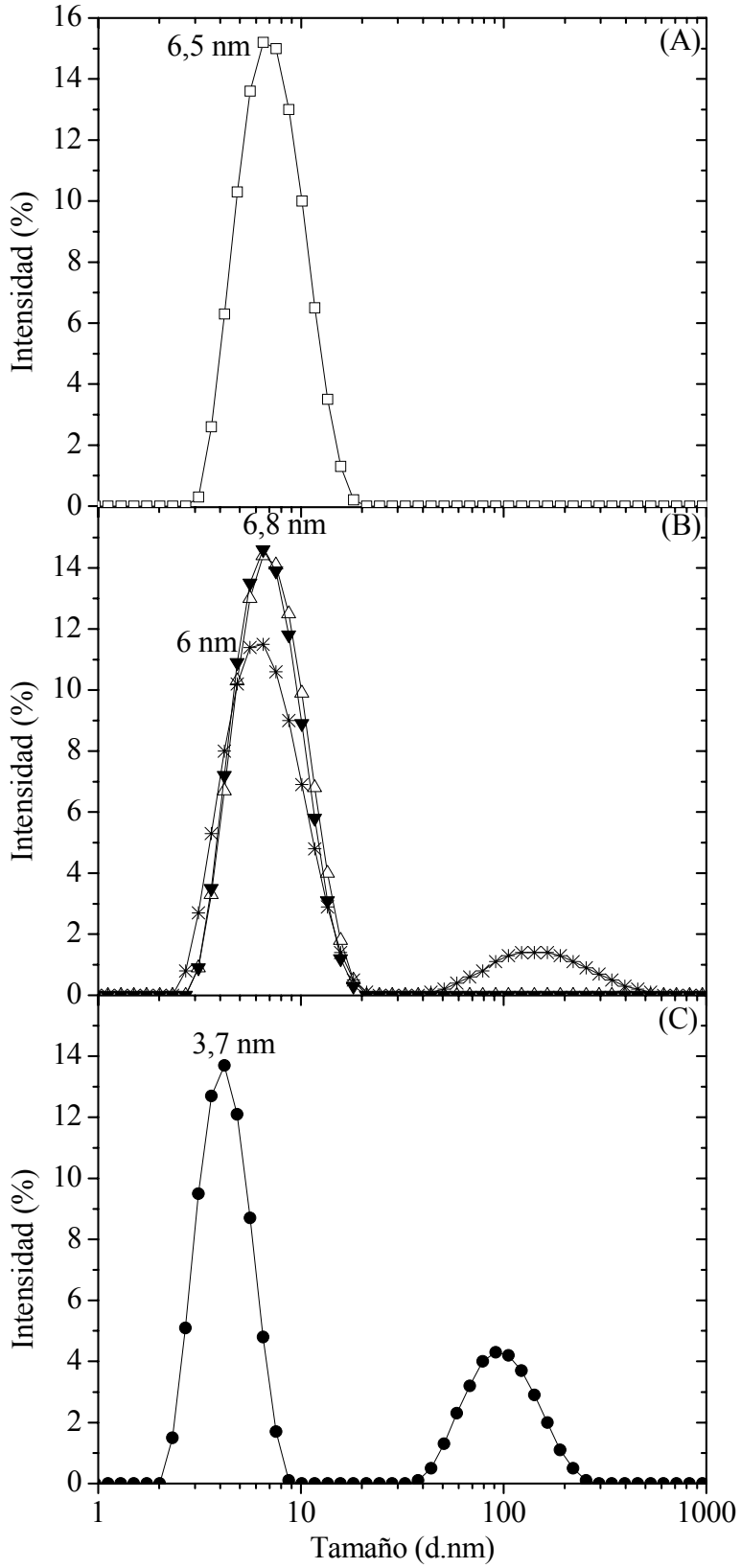


Figura I.3.12. Distribución de tamaño de partícula por intensidad de soluciones (4 % proteína total) con una relación CMP:β–lg: (A) (□) 0:100, (B) (△) 25:75, (▼) 50:50 y (✳) 75:25 y (C) (●) 100:0. Temperatura 25 °C, pH 7 y I = 0,05 M.

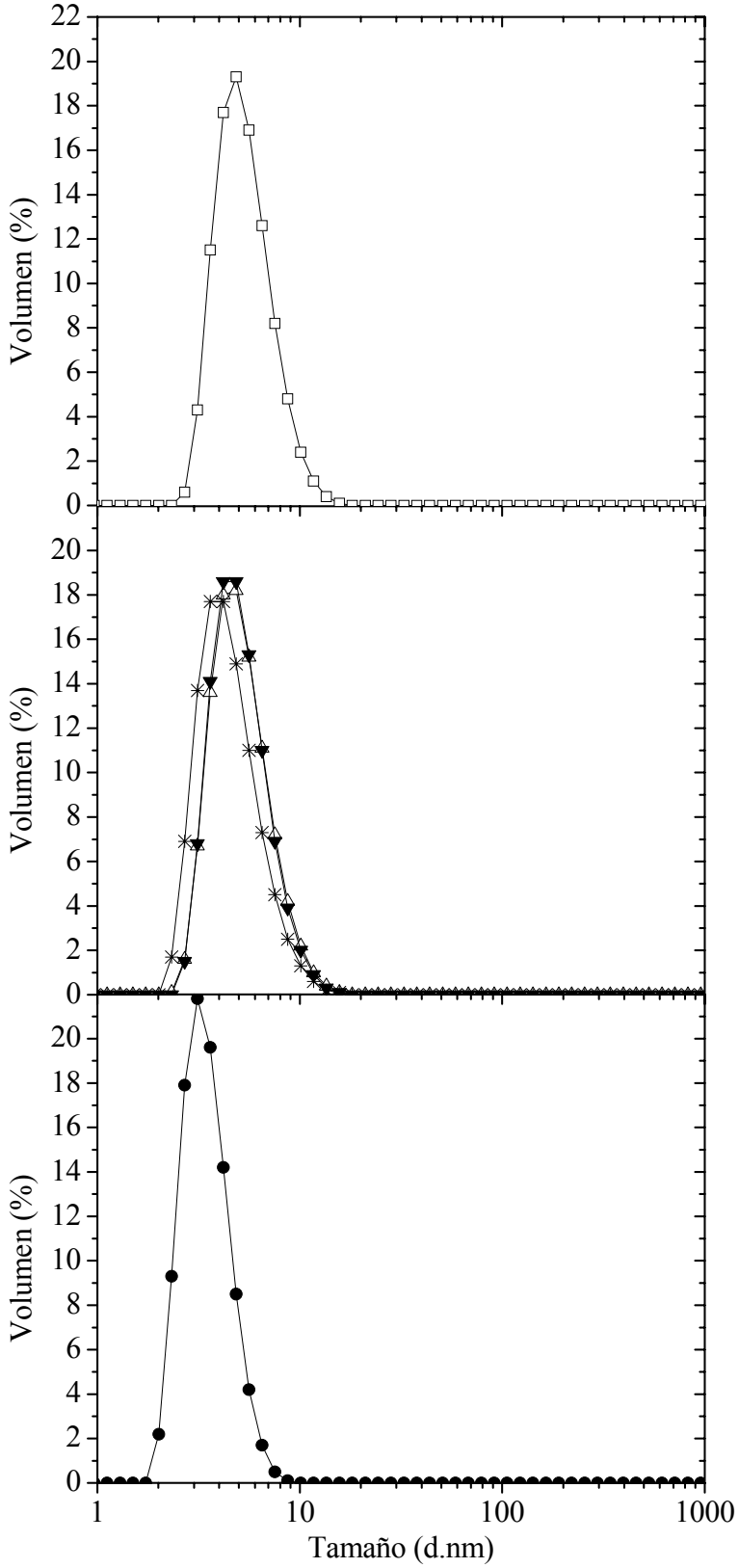


Figura I.3.13. Distribución de tamaño de partícula por volumen de soluciones (4 % proteína total) con una relación CMP:β–lg: (A) (□) 0:100, (B) (△) 25:75, (▼) 50:50 y (✳) 75:25 y (C) (●) 100:0. Temperatura 25 ºC, pH 7 y I = 0,05 M.

Las **Figuras I.3.12** y **I.3.13** muestran también las distribuciones de tamaño de partícula por intensidad y volumen de los sistemas mixtos CMP:β–lg. En las mezclas (25:75, 50:50 y 75:25) se observó una distribución monomodal y similar. En la mezcla con la mayor relación CMP:β–lg (75:25) se observó el pico correspondiente a grandes agregados de CMP (de aproximadamente 100 nm) pero con mucha menor intensidad que para el sistema CMP solo, mientras que para los otros dos sistemas mixtos no se observó dicho pico. Por otro lado, el pico de menor tamaño presente en la distribución de tamaño de partícula por intensidad del CMP solo (con *d(H)* máximo de 4,2 nm) no se observó en los sistemas mixtos, sino que la posición del pico fue más similar a la de la β–lg sola o levemente mayor.

Este comportamiento evidencia nuevamente la posibilidad de complejamiento entre CMP y β–lg como fue analizado en la **Figura I.1.33**, que fue confirmado a partir del análisis de los sistemas por DSC (**Tabla I.1.2**).

I.3.2.2. Hidrofobicidad superficial.

En la **Figura I.3.14** se muestra la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de proteína para los sistemas simples y mixtos CMP:β–lg.

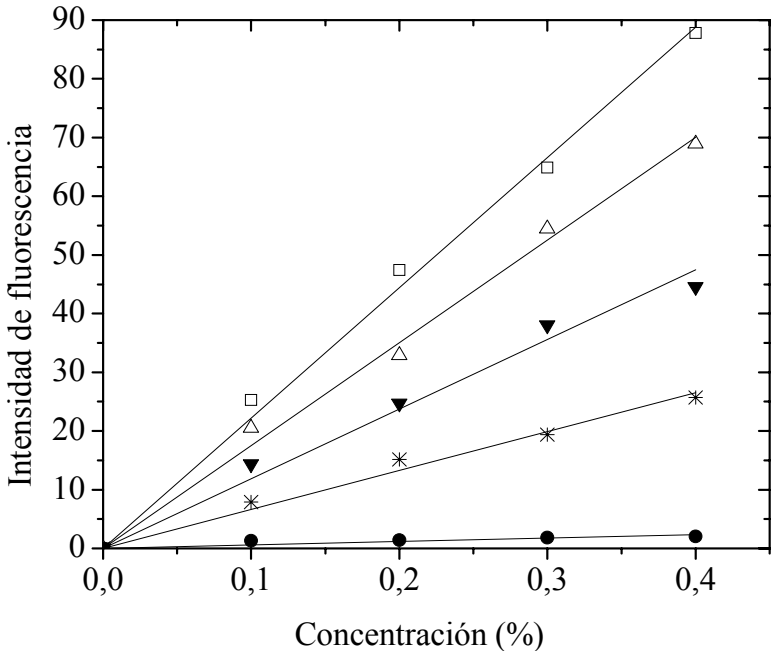


Figura I.3.14. Intensidad de fluorescencia de mezclas CMP:β–lg (0,4 % proteína total) en las siguientes relaciones: (□) 0:100, (△) 25:75, (▼) 50:50, (✳) 75:25 y (●) 100:0. Temperatura 25 ºC, pH 7.

La hidrofobicidad (pendiente del gráfico de intensidad de fluorescencia en función de la concentración de proteína) del CMP fue extremadamente baja (H_o = 5,88) en comparación con la hidrofobicidad de la β–lg (H_o = 222). El valor de H_o para los sistemas CMP:β–lg 25:75, 50:50 y 75:25 fue 175,1, 118,6 y 66,35, respectivamente, los cuales son los valores esperados en base a la proporción de los componentes puros en las mezclas. Estos resultados no evidencian la presencia de interacciones hidrofóbicas entre CMP y β–lg.

Los resultados derivados de la determinación de tamaño de partícula (**Figuras I.3.12** y **I.3.13**) sumado a los resultados de DSC y electroforesis mostrados en el apartado **I.1.3** del **Capítulo 1** de esta sección, son consistentes con la formación de complejos CMP:β–lg en buffer Trizma. La formación de estos complejos puede ser debida a interacciones electroestáticas y/o uniones puente hidrógeno entre CMP y β–lg.

I.3.2.3. Propiedades interfaciales de sistemas mixtos CMP:β–lg.

Isoterma de adsorción de los sistemas mixtos CMP:β–lg.

Las interacciones que se producen en la interfase aire–agua entre el CMP y la β–lg, se analizaron en primer lugar por tensiometría (**Figura I.3.16**).

Se observa que el valor de presión superficial en el equilibrio del CMP (a la concentración de proteína de 4 % p/p en la fase acuosa) es 34,5 mN/m, mucho mayor que el correspondiente a la β–lg (23 mN/m).
Los valores de presión superficial de los sistemas mixtos CMP:β–lg 25:75, 50:50 y 75:25 fueron ligeramente mayores que los obtenidos para la β–lg sola, lo cual indica que ésta domina la presión superficial en el equilibrio de estos sistemas mixtos.

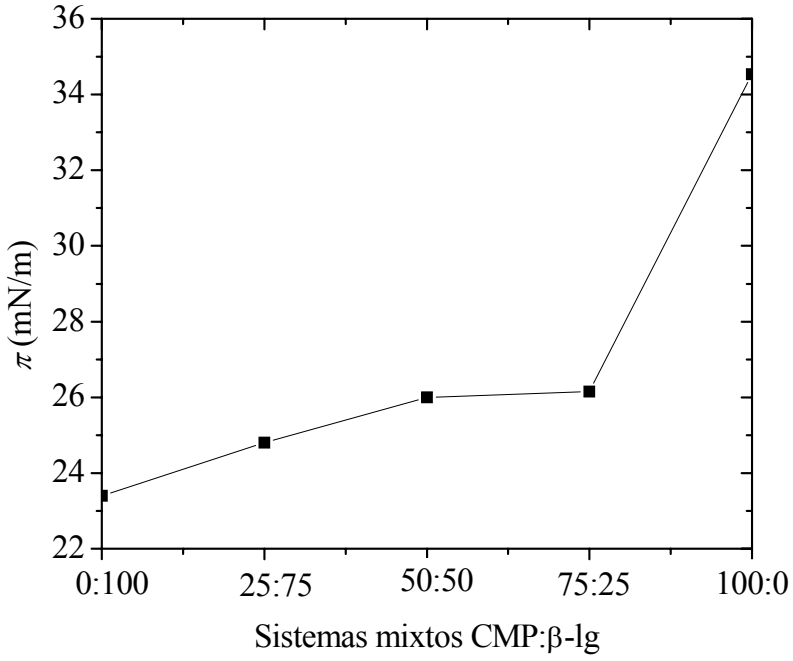


Figura I.3.16. Presión superficial en el equilibrio de los sistemas mixtos CMP:β–lg. Concentración total de proteína: 4 % p/p. Temperatura 20 ºC, pH 7 y I = 0,05 M.

Cinética de adsorción.

En la **Figura I.3.17** se muestra la variación de la presión superficial (π) en función del tiempo para los sistemas CMP:β–lg. El CMP (4 % p/p) presentó mayores valores de π que la β–lg (4 % p/p) y que los tres sistemas mixtos lo cual coincide con lo observado para la presión de equilibrio (**Figura I.3.16**).

La cinética de adsorción de los sistemas mixtos se parece más a la correspondiente a la β–lg. Resulta interesante el hecho de que en el caso del sistema mixto con relación CMP:β–lg 25:75 la adsorción es más lenta que la correspondiente a la β–lg, lo cual nos indica que podría producirse un complejamiento entre ambas proteínas. Este resultando es consistente con el mayor grado de interacción observado, en esta relación de proteínas, en la temperatura de inicio de desnaturalización (**Tabla I.1.2**). En un trabajo reciente *(Ganzevles, Kosters, van Vliet, Cohen Stuart & de Jongh, 2007)* se ha observado que el complejamiento que se produce entre la β–lg y polisacáridos puede disminuir la velocidad de adsorción.

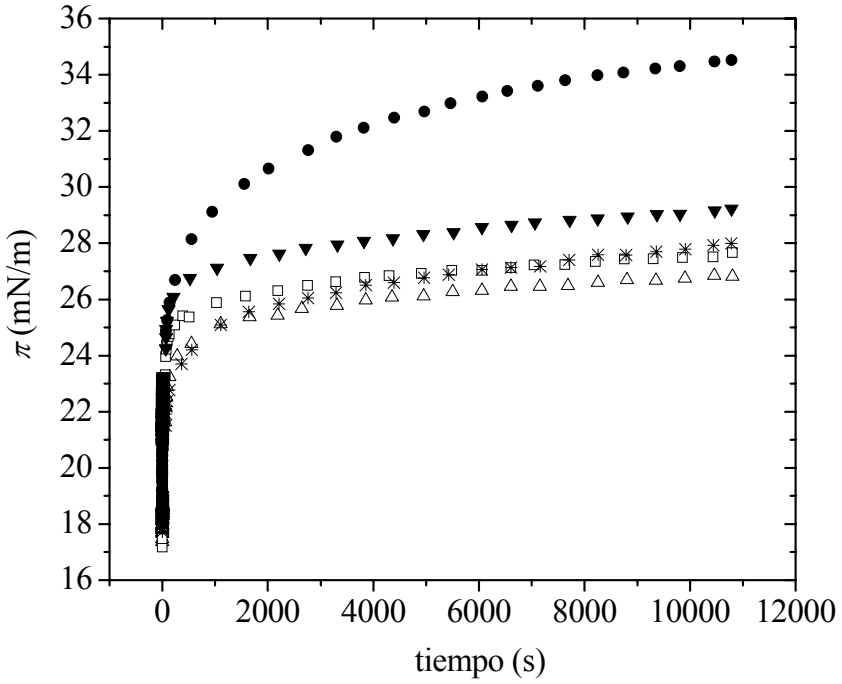


Figure I.3.17. Evolución de la presión superficial (π) en el tiempo para los sistemas CMP:β–lg con relación: (□) 0:100, (△) 25:75, (▼) 50:50 y (✳) 75:25 y (●) 100:0 en la interfase aire–agua. Concentración total de proteína: 4 % p/p. Temperatura 20 ºC, pH 7 y I = 0,05 M.

En la **Tabla I.3.5** se presentan los resultados del análisis de la cinética de adsorción de los sistemas mixtos en comparación con cada componente y el valor de π al final de la medición (10800 s). Los valores de π obtenidos para la β–lg coinciden con datos publicados previamente por *Álvarez Gómez & Rodríguez Patino (2006)*.

Tabla I.3.5. Parámetros característicos para la adsorción del CMP, β–lg y los sistemas mixtos CMP:β–lg en la interfase aire–agua, a 20 ºC, pH 7 y fuerza iónica 0,05 M.

CMP:β–lg	$K_{ads}.10^4$ (s^{-1}) (LR)*	$K_r.10^4$ (s^{-1}) (LR)*	π_{10800} (mN/m)*
0:100	2,335 ± 0,005 (0,994)	4,36 ± 0,55 (0,965)	27,5 ± 0,3
25:75	2,71 ± 0,06(0,993)	6,97 ± 0,48 (0,94)	26,9 ± 0,2
50:50	2,67 ± 0,16 (0,995)	6,91 ± 1,79 (0,93)	29,1 ± 0,2
75:25	2,25 ± 0,02 (0,992)	8,71 ± 1,89 (0,95)	28,1 ± 0,3
100:0	2,56 ± 0,32 (0,996)	7,62 ± 0,47 (0,94)	34,4 ± 0,2

Símbolos: K_{ads}: Constante cinética de adsorción (penetración), K_r: constante cinética de reordenamiento, π_{10800}: presión superficial a los 10800 s. Concentración total de proteína: 4 %.
*promedio ± desvío estándar.

Las velocidades de adsorción/penetración para los componentes solos y para los sistemas mixtos fueron similares, lo que coincide con la alta concentración proteica existente en la interfase debido a la rápida difusión. Sin embargo, la velocidad de reordenamiento del CMP fue más alta que la de β–lg. Estos resultados concuerdan con la hipótesis de *Graham & Phillips (1979b)* referida a que el tiempo de reordenamiento de las moléculas proteicas adsorbidas es mucho más pequeño para proteínas flexibles "random coil" (por ejemplo, CMP) que para proteínas globulares (por ejemplo, β–lg). Las velocidades de reordenamiento de todos los sistemas mixtos fueron similares a la del CMP solo; esto sugiere que la β–lg se reordena más rápidamente en presencia de CMP, lo que puede ser atribuido a algún grado de interacción entre ambas proteínas que facilitaría el reordenamiento conformacional de la β–lg en la interfase (por ejemplo, la desnaturalización superficial). Como fue mencionado anteriormente en la **Tabla I.1.2**, la desnaturalización térmica de β–lg es también facilitada en presencia de CMP.

Reología interfacial de los sistemas CMP:β–lg.

En la **Figura I.3.19A** y **B** se puede observar la variación de las propiedades reológicas superficiales (elasticidad dilatacional superficial, E_d, y tangente del ángulo de fase, *tan* δ) de las películas interfaciales de las películas mixtas en comparación con las de CMP y β–lg.

El aumento observado de E_d o el descenso de *tan* δ, en función del tiempo revela la adsorción de las proteínas en la interfase aire–agua *(Martínez, Carrera Sánchez, Pizones Ruiz-Henestrosa, Rodríguez Patino & Pilosof, 2007; Rodríguez Patino, Rodríguez Niño & Carrera Sánchez, 1999b)*. El hecho de que esta variación de E_d siga la misma tendencia que la presión superficial (**Figura I.3.17**), indica que E_d depende de la cantidad de proteína que hay presente en la interfase, que aumenta en función del tiempo.

La película interfacial de CMP presentó una mayor viscoelasticidad relativa (*tan* δ = 0,21) que la de β–lg (*tan* δ = 0,36); sin embargo, el valor de la componente elástica (E_d) es tres veces mayor para la película interfacial de β–lg, que para la de CMP. El CMP presenta interacciones proteína–proteína más débiles que las correspondientes a la β–lg. La capacidad de formación

de películas interfaciales elásticas de proteínas globulares como la β–lg es mayor que la de proteínas desordenadas como el CMP *(Thomä Worringer, Siegert & Kulozik, 2007)*.

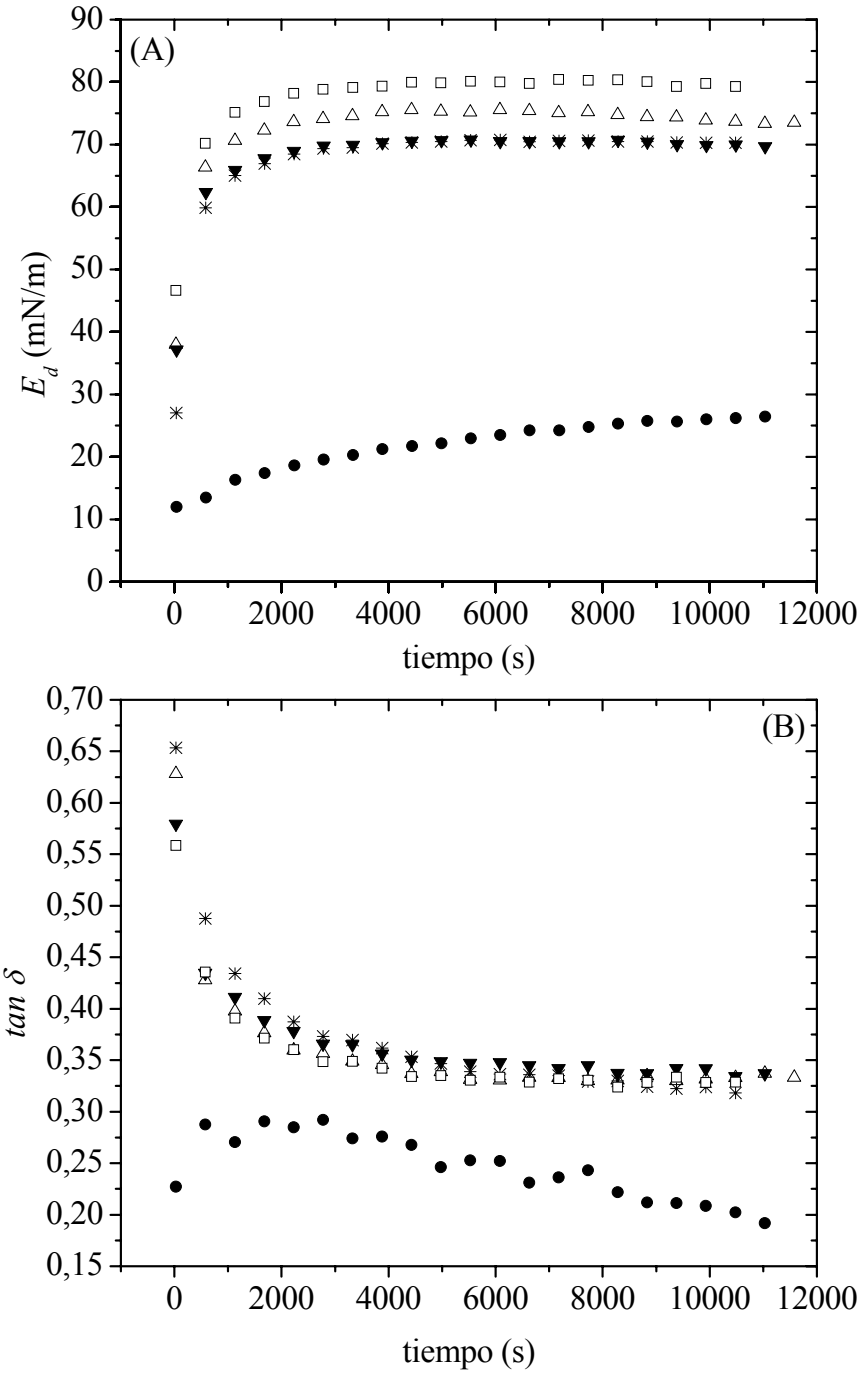


Figura I.3.19. Evolución de (A) la elasticidad dilatacional superficial (E_d) y (B) la tangente del ángulo de fase (*tan δ*), con el tiempo, para los sistemas CMP:β–lg: (□) 0:100, (△) 25:75, (▼) 50:50 y (✳) 75:25 y (●) 100:0 adsorbidos en la interfase aire–agua. Concentración total de proteína: 4 % p/p. Frecuencia: 100 mHz. Amplitud de deformación: 15 %. Temperatura 20 °C, pH 7, y I = 0,05 M.

La variación de los parámetros reológicos en función del tiempo, para los sistemas mixtos, presentó una tendencia similar a la de las películas interfaciales de β–lg. Estos resultados muestran el papel dominante que ejerce la β–lg sobre el comportamiento reológico de dichas películas mixtas, a pesar de que el CMP presenta una mayor actividad interfacial.

En la **Figura I.3.20** se puede ver la variación del módulo dilatacional superficial (*E*) con respecto a la presión superficial (π) para la adsorción de β–lg, de CMP y de los sistemas mixtos. Como se dijo en el apartado anterior, si el módulo dilatacional superficial (*E*) solamente dependiera de la cantidad de macromoléculas adsorbidas en la interfase aire–agua, los valores de *E* deberían estar normalizados en una curva maestra de *E* frente a π *(Pérez, Carrera Sánchez, Rodríguez Patino & Pilosof, 2008)*.

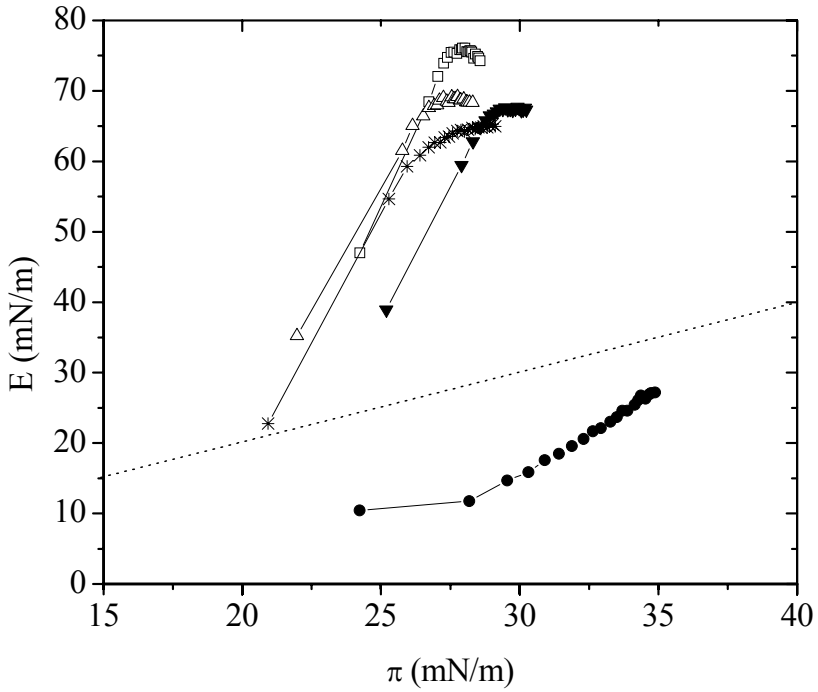


Figura I.3.20. Variación del módulo dilatacional superficial (*E*) en función de la presión superficial (π) para los sistemas mixtos CMP:β–lg: (□) 0:100, (△) 25:75, (▼) 50:50 y (✳) 75:25 y (●) 100:0 adsorbidos en la interfase aire–agua. Concentración total de proteína: 4 % p/p. La línea de puntos corresponde al comportamiento de un gas ideal. Temperatura 20 ºC, pH 7 y I = 0,05 M.

En esta figura se observa que esa normalización no se logra en los sistemas estudiados. Las curvas E–π reflejan la cantidad de proteína adsorbida en la interfase (mayores valores de *E*

con el aumento la presión superficial) y/o el grado de interacción que existe entre dichas moléculas. Como se ha podido comprobar con otras proteínas *(Rodríguez Patino et al., 1999b)*, *E* aumenta con la presión superficial; esta dependencia indica la existencia y el aumento de interacciones entre los componentes que forman la película interfacial, que son mayores a tiempos altos de adsorción, lo cual está de acuerdo con la teoría de *Lucassen–Reynders, Lucassen, Garrett, Giles, & Hollway (1975)*.

La pendiente que resulta de estas curvas $E–\pi$ es mayor que uno (característico del comportamiento de un gas ideal) para todos los sistemas analizados, lo cual indica un comportamiento no ideal con más interacciones moleculares entre los componentes que forman la película superficial, que en el caso del comportamiento de un gas ideal *(Lucassen-Reynders et al., 1975)*. Sin embargo, el CMP presenta un comportamiento diferente, pues el módulo dilatacional superficial únicamente crece significativamente a partir de valores de presión superficial de 28 mN/m, indicando que se necesita una alta concentración de CMP en la interfase aire–agua para que se produzcan interacciones intermoleculares que aporten a la película interfacial un nivel de estructuración apreciable.

En el caso de las películas interfaciales de la β–lg, el mayor valor de *E* se alcanza a una presión superficial de 28 mN/m. Además, para estos valores de presión superficial, la elasticidad dilatacional de β–lg fue seis veces mayor que para la película interfacial de CMP (**Figura I.3.20**). Los datos correspondientes a las películas mixtas son semejantes a los obtenidos para las películas de β–lg pura, y las pendientes fueron mayores que las correspondientes al CMP puro, indicando una vez más que la β–lg domina la reología interfacial en los sistemas.

Como se demostró, estas proteínas interaccionan en la fase acuosa mediante interacciones electrostáticas o puentes de hidrógeno. Por tanto, la β–lg dificulta la adsorción del CMP. No obstante, la rápida formación de una película elástica de β–lg, que previene la adsorción y penetración de una cantidad suficiente de CMP como para variar la presión superficial, podría contribuir al comportamiento observado en los sistemas mixtos. El mayor grado de interacciones macromoleculares que tiene lugar en las películas interfaciales de β–lg, podría dominar, en los sistemas mixtos, a la menor concentración de β–lg empleada (sistemas mixtos con una relación CMP:β–lg 75:25). En este sistema, la concentración de β–lg (1 % p/p) es suficiente como para saturar la interfase y establecer fuertes interacciones intermoleculares

(Álvarez Gómez & Rodríguez Patino, 2006). Esta hipótesis se ha empleado para explicar el desplazamiento del diglicerol–monolaureato por la β–lg en la interfase aire–agua *(Álvarez Gómez, Pizones Ruiz-Henestrosa, Carrera Sánchez & Rodríguez Patino, 2008)*.

A partir de los resultados obtenidos en este capítulo se puede concluir que aunque el CMP presenta una mayor actividad superficial que la β–lg, cuando ambos están presentes en el medio acuoso, es la β–lg la que domina la presión superficial dinámica y estática y las propiedades reológicas de las películas interfaciales. Estos resultados son los que sugieren que la β–lg dificulta la adsorción del CMP, ya que es el CMP quien debería dominar debido a su mayor actividad superficial.

I.3.3. Referencias.

Álvarez Gómez, J. M., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M., Carrera Sánchez, C., & Rodríguez Patino, J. M. (2008). The role of static and dynamic characteristics of diglycerol esters and β-lactoglobulin mixed films foaming. 1. Dynamic phenomena at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, *22*(6), 1105-1116.

Álvarez Gómez, J. M., & Rodríguez Patino, J. M. (2006). Formulation engineering of food model foams containing diglycerol esters and β-Lactoglobulin. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *45*(22), 7510-7519.

Álvarez Gómez, J. M., & Rodríguez Patino, J. M. (2007). Viscoelastic Properties of Diglycerol Ester and Protein Adsorbed Films at the Air-Water Interface. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *46*(9), 2693-2701.

Baeza, R. I., Carrera Sánchez, C., Pilosof, A. M. R., & Rodríguez Patino, J. M. (2004). Interactions of polysaccharides with β-lactoglobulin spread monolayers at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, *18*, 959-966.

Benjamins, J. (2000). Static and Dynamic Properties of Protein Adsorbed at Liquid Interfaces. *Laboratorium voor Fysische chemie en kolloïdkunde*, vol. Ph.D. Wageningen, The Netherlands: University of Wageningen

Burova, T. V., Grinberg, N. V., Visschers, R. W., Grinberg, V. Y., & de Kruif, C. G. (2002). Thermodynamic stability of porcine b-lactoglobulin. A structural relevance. *European Journal Biochemistry*, *269*, 3958-3968.

Cornec, M., Dennis, A. K., & Narsimhan, G. (2001). Adsorption dynamics and interfacial properties of a-lactalbumin in native and molten globule state conformation at air-water interface. *Food Hydrocolloids*, *15*, 303-313.

Chu, L., Macleod, A., & Ozimek, L. (1996). Isolation of glycomacropeptide from sodium caseinate hydrolysate solution by ultrafiltration. . *Milchwissenschaft*, *51*, 303-306.

Damodaran, S., & Song, K. B. (1988). Kinetics of adsorption of proteins at interfaces: role of protein conformation in diffusional adsorption. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, *954*, 253-264.

Galazka, V. B., & Dickinson, E. (1995). Surface properties of protein layers adsorbed from mixtures of gelatin with various caseins. *Journal of Texture Studies*, *26*, 401-409.

Ganzevles, R. A., Kosters, H., van Vliet, T., Cohen Stuart, M. A., & de Jongh, H. H. J. (2007). Polysaccharide charge density regulating protein adsorption to air/water interfaces by protein/polysaccharide complex formation. *The Journal of Physical Chemistry B*, *111*, 12969-12976.

Graham, D. E., & Philips, M. C. (1979). Proteins at liquid interfaces: II. Adsorption isotherms. *Journal of Colloid and Interface Science*, *70*, 415-426.

Graham, D. E., & Phillips, M. C. (1979a). Proteins at liquid interfaces : I. Kinetics of adsorption and surface denaturation. *Journal of Colloid and Interface Science*, *70*(3), 403-414.

Graham, D. E., & Phillips, M. C. (1979b). Proteins at liquid interfaces : III. Molecular structures of adsorbed films. *Journal of Colloid and Interface Science*, *70*(3), 427-439.

Guzey, D., McClements, D. J., & Weiss, J. (2003). Adsorption kinetics of BSA at air-sugar solution interfaces as affected by sugar type and concentration. *Food Research International*, *36*, 649-660.

Kawasaki, Y., Kawakami, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Tomizawa, A., & Kotake, M. (1993). pH-dependent molecular weight changes of kappa-casein glycomacropeptide and its preparation by ultrafiltration. *Milchwissnschaft*, *48*, 191-196.

Kim, S. H., & Kinsella, J. E. (1985). Surface activity of food proteins: relationships between surface pressure development, viscoelasticity of interfacial films and foam stability of bovine serum albumin. *Journal of Food Science*, *50*, 1526-1530.

Kitabatake, N., & Doi, E. (1988). Surface tension and foamability of protein and surfactant solutions. *Journal of Food Science*, *53*(5), 1542-1569.

Kreuβ, M., Krause, I., & Kulozik, U. (2008). Separation of a glycosylated and non-glycosylated fraction of caseinomacropeptide using different anion-exchange stationary phases. *Journal of Chromatography A*, *1208*, 126-132.

Lucassen-Reynders, E. H., Lucassen, J., Garrett, P. R., Giles, D., & Hollway, F. (1975). Dynamic surface measurements as a tool to obtain equation-of-state data for soluble monolayers. *Advances in Chemical Series 144*, 272-285.

MacRitchie, F. (1990). *Chemistry at interfaces*. San Diego, CA: Academic Press.

MacRitchie, F., & Alexander, A. E. (1963). Kinetics of adsorption of proteins at interfaces. Part III. The role of electrical barriers in adsorption. *Journal of Colloid Science*, *18*(5), 464-469.

Martínez, K. D., Carrera Sánchez, C., Pizones Ruiz-Henestrosa, V., Rodríguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2007). Soy protein-polysaccharides interactions at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, *21*, 804-812.

McGuffey, M. K., Otter, D. E., van Zanten, J. H., & Foegeding, E. A. (2007). Solubility and aggregation of commercial α-lactalbumin at neutral pH. *International Dairy Journal*, *17*, 1168-1178.

Mikkelsen, T., FrØkiœr, C., Topp, C., Bonomi, F., Iametti, S., Picariello, G., Ferranti, P., & Barkholt, V. (2005). Caseinomacropeptide self-association is dependent on whether the peptide is free or restricted in κ-casein *Journal of Dairy Science*, *88*, 4228-4238.

Mollé, D., & Leonil, J. (2005). Quantitative determination of bovine κ-casein macropeptide in dairy products by liquid chromatography/electrospray coupled to mass spectrometry (LC-ESI/MS) and liquid chromatography/electrospray coupled to tamdem mass spectrometry (LS-ESI/MS/MS). *International Dairy Journal*, *15*, 419-428.

Narsimhan, G., & Uraizee, F. (1992). Kinetics of adsorption of globular proteins at an air-water interface. *Biotechnology Prog*, *8*, 187-196.

Nawar, W. W. (1985). Chapter 5. *Food Chemistry*. New York: Marcel Dekker.

Pérez, O. E. (2005). Funcionalidad de Proteínas Alimentarias: Modificaciones inducidas por la aplicación de campos eléctricos pulsantes y por interacción con polisacáridos. *Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. PhD* (p. 262). Buenos Aires, Argentina.

Pérez, O. E., Carrera Sanchez, C., Rodríguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2006). Thermodynamic and Dynamic Characterization of Hydroxypropylmethylcellulose adsorved films at the air water interfase. *Biomacromolecules*, *7*, 388-393.

Pérez, O. E., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2007). Adsorption dynamics and surface activity at equilibrium of whey proteins and hydroxypropyl-methyl-cellulose mixtures at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, *21*, 794-803.

Pérez, O. E., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2008). Dynamics of adsorption of hydroxypropyl methylcellulose at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, *22*, 387-402.

Poole, S., & Fry, J. C. (1987). High-performance protein foaming and gelation systems. En: B. J. F. Hudson, *Development in food proteins*. London and New York: Elsevier applied Science.

Rodríguez Niño, M. R., Carrera Sánchez, C., Ruíz-Henestrosa, V. P., & Patino, J. M. R. (2005). Milk and soy protein films at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, *19*(3), 417-428.

Rodríguez Niño, M. R., & Rodríguez Patino, J. M. (1998a). Surface tension of bovine albumin and tween 20 at the air-aqueous phase interface. *Journal American Oil Chemistry Society*, *75*, 1241-1248.

Rodríguez Niño, M. R., & Rodríguez Patino, J. M. (1998b). Surface tension of protein and insoluble lipids at the air-aqueous phase interface. *Journal American Oil Chemistry Society*, *75*, 1233-1239.

Rodríguez Niño, M. R., & Rodríguez Patino, J. M. (2002). Effect of the Aqueous Phase Composition on the Adsorption of Bovine Serum Albumin to the Air-Water Interface. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *41*, 1489-1495.

Rodríguez Patino, J. M., Carrera Sánchez, C., & Rodríguez Niño, M. R. (1999a). Structural and morphological characteristics of b-casein monolayers at the air-water interface by Brewster angle microscopy. *Food Hydrocolloids*, *13*, 401-408.

Rodríguez Patino, J. M., Carrera Sánchez, C., & Rodríguez Niño, M. R. (2008). Physico-chemical properties of surfactant and protein films. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *12*, 187-195.

Rodríguez Patino, J. M., Molina Ortiz, S. E., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Niño, M. R., & Añón, M. C. (2003). Dynamic properties of soy globulin adsorbed films at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, *268*(1), 50-57.

Rodríguez Patino, J. M., & Rodríguez Niño, M. R. (1995). Protein adsorption and protein-lipid interactions at the air-aqueous solutin interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *103*, 91-103.

Rodríguez Patino, J. M., Rodríguez Niño, M. R., & Carrera Sánchez, C. (1999b). Adsorption of whey protein isolate at the air-water interface as a function of processing conditions: A rheokinetic study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 2241-2248.

Rodríguez Patino, J. M., Rodríguez Niño, M. R., Carrera Sánchez, C., Molina, S., & Añón, C. (2005). Dilational properties of soy globulin adsorbed film at the air-water interface from acidic solutions. *Journal of Food Engineering*, *68*(4), 429-437.

Rodríguez Patino, J. M., Rodríguez Niño, M. R., Carrera Sánchez, C., Navarro García, J. M., Rodríguez Rodríguez Mateos, G., & Cejudo Fernández, M. (2001). The effect of temperature on food emulsifiers at fluid-fluid interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *21*, 87-99.

Silva-Hernández, E., Nakano, T., & Ozimek, L. (2002). Isolation and analysis of κ-casein glycomacropeptide from goat sweet whey. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 2034-2038.

Suttiprasit, P., Krisdhasima, V., & McGuire, J. (1992). The surface activity of α-lactalbumin, β-lactoglobulin, and bovine serum albumin. *Journal of Colloid and Interface Science*, *154*(2), 316-326.

Thomä Worringer, C., Siegert, N., & Kulozik, U. (2007). Foaming properties of caseinomacropeptide - 1. Impact of concentration and interactions with whey proteins. *Milchwissenschaft*, *62*, 249-252.

Tornberg, E. (1978). The applacation of the drop volume technique to measurements of the adsorption of proteins at interfase. *Journal of Colloid and Interfase Science*, *64*, 391-402.

Walstra, P. (1990). Dairy Foods. On the stability of casein micelles. *Journal of Dairy Science*, *73*, 1965-1979.

SECCIÓN II

Interacciones entre proteínas lácteas y polisacáridos

Objetivo.

El objetivo de esta sección fue estudiar las interacciones entre proteínas lácteas y polisacáridos y su impacto en la formación de geles e interfases.

¿Por qué es importante estudiar las interacciones de los sistemas mixtos CMP o β–lg y polisacáridos?

i) **porque los polisacáridos son biopolímeros muy utilizados en sistemas alimentarios.** Los polisacáridos contribuyen a importantes características estructurales en numerosos sistemas alimentarios *(Walter, 1998)* entre las más importantes se encuentra su capacidad gelificante *(Morris & Rees, 1978; Morris, 1998)* y su capacidad para estabilizar espumas y emulsiones *(Carp, Barholomai, Relkin & Pilosof, 2001; Dickinson, 1998)*.

ii) p**orque los sistemas mixtos proteína–polisacárido suelen conceder al alimento propiedades mejoradas respecto a las que proporcionan ambos componentes en forma individual.** Las proteínas y los polisacáridos contribuyen a las características estructurales y texturales de muchos coloides alimentarios por su comportamiento durante la agregación y gelificación *(Dickinson, 1993)*.

iii) **porque la manipulación inteligente de mezclas de biopolímeros, proteínas y polisacáridos, es una vía promisoria para la generación de nuevas estructuras y texturas en los alimentos así como para la obtención de micro y nanoestructuras con diferentes aplicaciones.**

Referencias.

Carp, D. J., Barholomai, G. B., Relkin, P., & Pilosof, A. M. R. (2001). Effects of denaturation on soy protein–xanthan interactions: comparison of a whipping–rheological and a bubbling method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *21*, 163-171.

Dickinson, E. (1993). Protein-polysaccharide interactions in food colloids. En: E. Dickinson, & P. Walstra, *Food Colloids and polymers: stability and mechanical properties* (pp. 77-93). Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.

Dickinson, E. (1998). Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions. *Trend in Food Science and Technology*, *9*, 347-354.

Morris, E. R., & Rees, D. A. (1978). Principles of biopolymer gelation: possible models for mucus gel structure. *British Medical Bulletin*, *34*, 49-53.

Morris, V. J. (1998). Gelation of polysaccharides. *Functional properties of food macromolecules* (pp. 143-226).

Walter, R. H. (1998). Origin and characteristics of polysaccharides. *Polysaccharide Dispersions* (pp. 1-28). San Diego: Academic Press.

SECCIÓN II

Capítulo 1

Interacciones entre proteínas lácteas y polisacáridos en solución acuosa

II.1. Interacciones proteína–polisacárido en solución.

Para poder entender el comportamiento de los sistemas proteína–polisacárido en geles e interfases es importante conocer primero, las interacciones que existen entre ellos en solución. Por eso, en este capítulo se estudió el comportamiento de los sistemas mixtos β–lg:PGA a pH 7 en solución. Las condiciones elegidas fueron las siguientes:

- ✓ La concentración de β–lg (de la firma Besnier & Bridel) en los sistemas mixtos fue 3 y 6 % p/p.
- ✓ Los PGA estudiados fueron: KO y KLVF descriptos previamente en la sección de **Materiales y Métodos**. Las concentraciones de ambos PGA en los sistemas mixtos fue: 0,5, 1, 1,5 y 2 % p/p. Además se estudió el comportamiento de KO y KLVF solos a una concentración de 0,1 % p/p.

II.1.1. Asociación/agregación de β–lg inducida por la presencia de polisacáridos a pH 7.

II.1.1.1. Efecto de la adición de polisacáridos a temperatura ambiente.

Antes de estudiar el efecto de la presencia de polisacáridos en las soluciones proteicas se analizó el comportamiento de las soluciones de los polisacáridos solos. La **Figura II.1.1** muestra la distribución de tamaño de partícula por intensidad y volumen de los dos polisacáridos utilizados en este estudio, KO y KLVF.

Ambos polisacáridos presentan, tanto en la distribución de intensidad como en la de volumen, poblaciones de tamaños mayores a 100 nm, valores muy superiores a los observados para las soluciones de proteína sola.

El tamaño esperado para estos polisacáridos en base a los pesos moleculares que presentan (entre 30 y 200 kDa) es mucho menor que el que se muestra en la **Figura II.1.1**. El comportamiento observado se puede atribuir al autoensamblaje (asociación espontánea) de estos alginatos de propilenglicol formando micelas o estructuras asociadas. De hecho, se ha reportado que los polisacáridos tienden a formar grandes estructuras asociadas en medio acuoso *(Doublier & Launay, 1981)*.

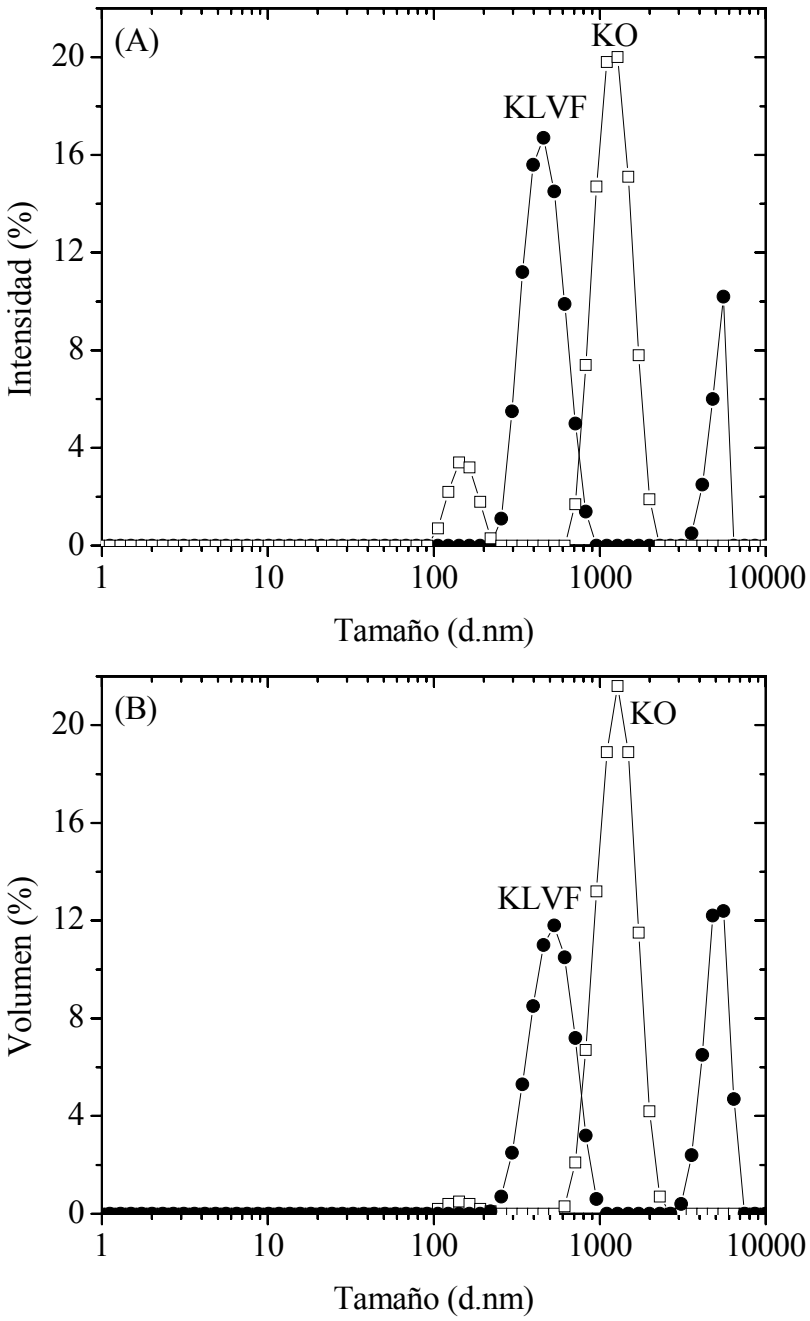


Figura II.1.1. Distribución de tamaño de partícula por intensidad (A) y volumen (B) de soluciones de KO (□) y KLVF (●) al 0,1 % p/p. Temperatura 25 °C, pH 7.

En la **Figura II.1.2** y **II.1.3** se puede observar el efecto del agregado de KO y KLVF, respectivamente sobre la distribución de tamaño de partícula de la β–lg (6 % p/p) a temperatura ambiente.

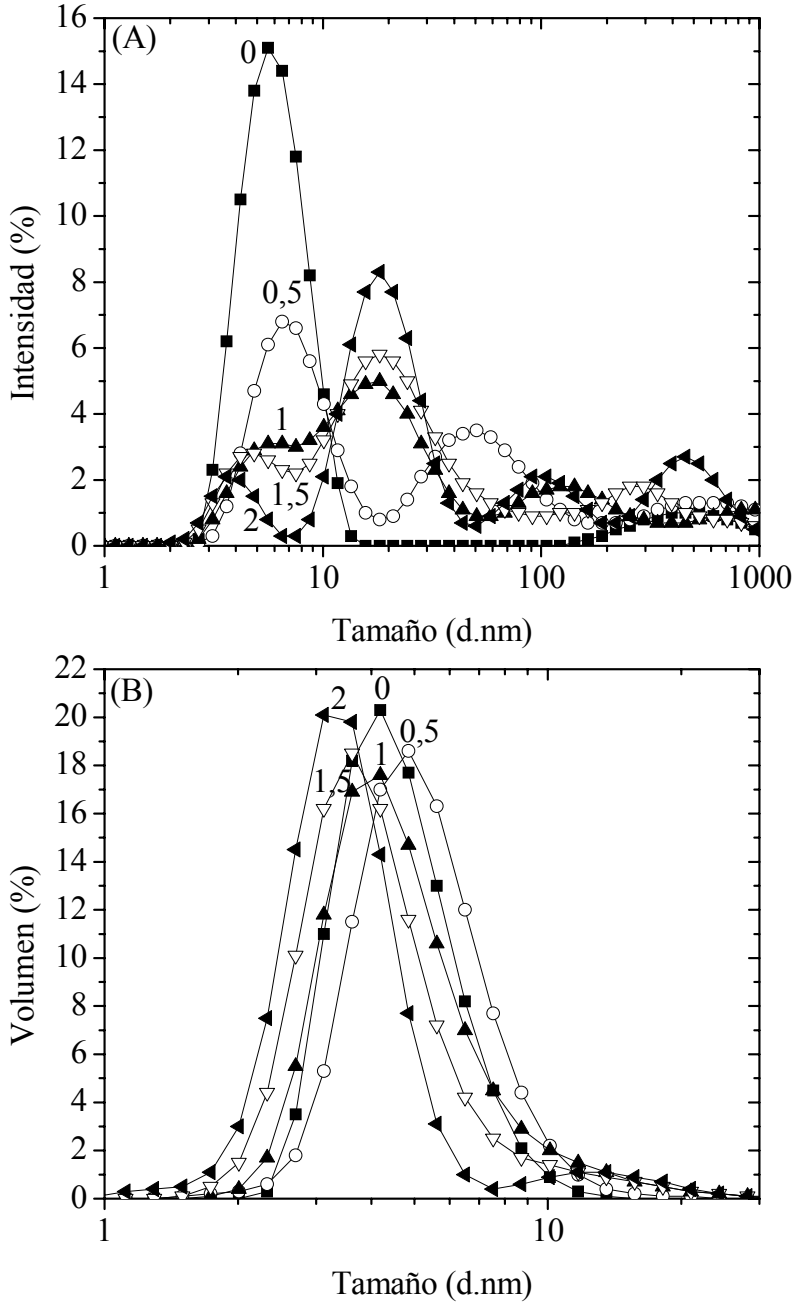


Figura II.1.2. Distribución de tamaño de partícula por (A) intensidad y (B) volumen de sistemas mixtos con 6 % p/p de β–lg y diferentes concentraciones de KO (% p/p): (■) 0 (β–lg pura), (○) 0,5, (▲) 1, (▽) 1,5, (◀) 2. Temperatura 25 °C, pH 7.

A medida que aumenta la concentración de polisacárido en los sistemas mixtos la intensidad del pico principal de la β–lg antes descripta en la **Figura I.1.1** de la **Sección I**, disminuye notablemente y aparecen y crecen picos correspondientes a formas asociadas.

El mismo efecto, aunque en menor magnitud, se observó en sistemas mixtos con 3 % p/p de β–lg (resultados no mostrados).

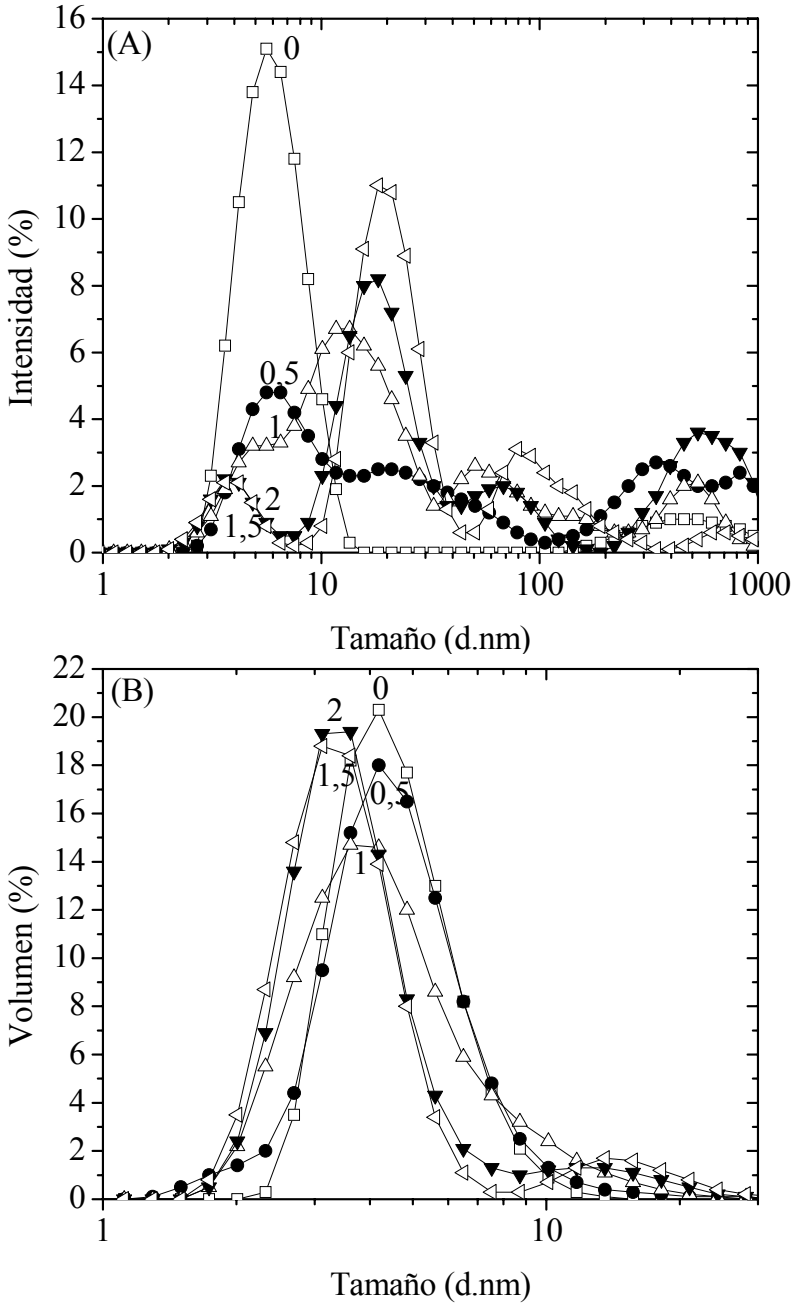


Figura II.1.3. Distribución de tamaño de partícula por (A) intensidad y (B) volumen de sistemas mixtos con 6 % p/p de β–lg y diferentes concentraciones de KLVF (% p/p): (□) 0 (β–lg pura), (●) 0,5, (△) 1, (▼) 1,5, (◁) 2. Temperatura 25 °C, pH 7.

En presencia de KO se puede observar que a medida que su concentración aumenta de 1 a 2 % p/p en el sistema mixto, aparece un pico en el rango de tamaño de 10 a 40 nm de diámetro (**Figura II.1.2A**), sin embargo la cantidad de partículas presentes en dicha población parece ser despreciable ya que al analizar los resultados en la distribución por volumen (**Figura II.1.2B**) sólo se observa una pequeño pico en tamaños cercanos a 10 nm para el sistema mixto con la mayor concentración de KO (2 % p/p).

Un comportamiento similar se encuentra al analizar las distribuciones de tamaño de partícula de los sistemas β–lg:KLVF, aunque la presencia del pico correspondiente a las formas asociadas se observa a concentraciones menores que en los sistemas β–lg:KO, tanto en la distribución por intensidad (**Figura II.1.3A**) como en la distribución por volumen (**Figura II.1.3B**).

Además es posible observar, en las distribuciones de intensidad y volumen para ambos polisacáridos, un leve corrimiento en la posición del pico de menor tamaño hacia tamaños menores a medida que aumenta la concentración de polisacárido. Este comportamiento podría deberse al hecho de que las estructuras asociadas de β–lg formadas en los sistemas mixtos lo harían a partir del monómero de la proteína, hecho que ha sido referenciado para otros factores que promueven la agregación de la proteína como es el caso de la temperatura, donde la agregación ocurre luego de una etapa previa de disociación del dímero de β–lg presente a pH 7, seguida del desplegamiento de estos monómeros para luego formar agregados más grandes, como fue explicado en la **Figura I.1.6A** al someter a soluciones de β–lg a tratamiento térmico.

En la **Figura II.1.4** se observa que el *d(H)* promedio (obtenido a partir del análisis de cumulantes) para los sistemas mixtos con ambos polisacáridos aumenta con la concentración de los mismos. Este aumento está dado por la aparición de picos en tamaños mayores, observado en las **Figuras II.1.2** y **II.1.3**. Además, se observan tamaños cinco veces más grandes para los sistemas mixtos con KLVF que aquellos obtenidos para los sistemas mixtos con KO para todas las concentraciones estudiadas.

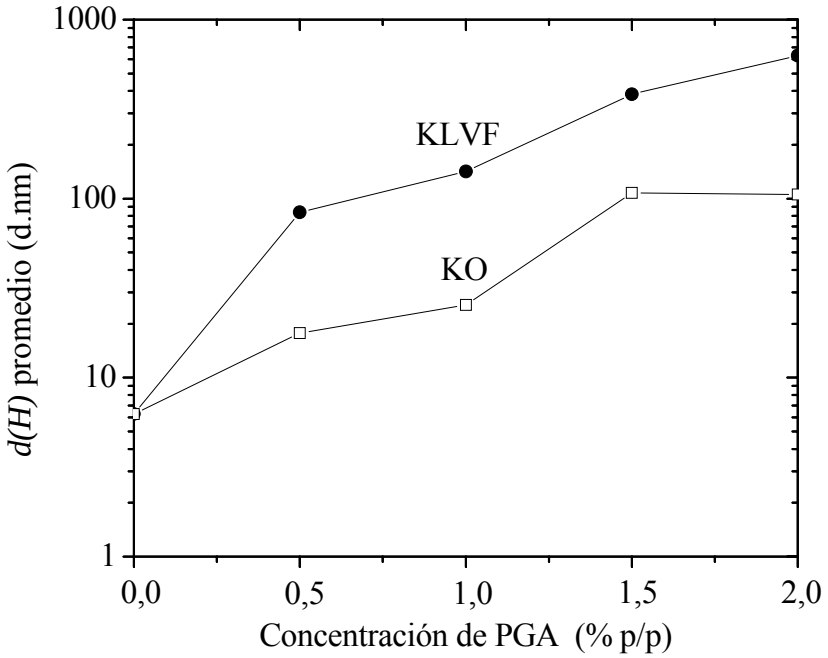


Figura II.1.4. Dependencia del *d(H)* promedio con la concentración de PGA en los sistemas mixtos con β–lg 6 % p/p: (□) KO y (●) KLVF Temperatura 25 °C, pH 7.

Para corroborar la formación de estructuras asociadas se realizó una corrida en gel electroforético en condiciones nativas (**Figura II.1.5**) de las soluciones de β–lg sola (6 % p/p) y β–lg:KO (6 % p/p – 2 % p/p). En ambos casos existe una banda mayoritaria de mayor movilidad que corresponde a la β–lg.

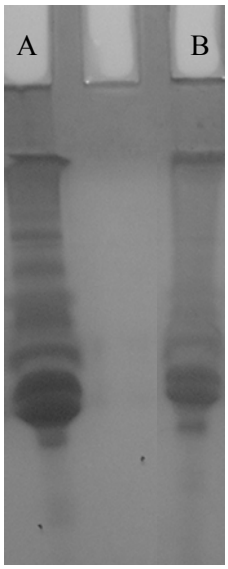


Figura II.1.5. PAGE electroforesis en condiciones nativas para las soluciones: (A) β–lg 6 % p/p y (B) β–lg 6 % p/p – KO 2 % p/p, pH 7.

Comparando las calles A y B (β–lg sola y sistema mixto, respectivamente), la banda atribuida a la β–lg fue más difusa en la calle B, sugiriendo la disminución de la banda de β–lg en la mezcla. La disminución de la banda correspondiente a la β–lg se correspondería con los resultados mostrados por dispersión dinámica de luz donde se observó una disminución del pico correspondiente a la β–lg y la formación de estructuras asociadas, aunque debido al tamaño de dichas estructuras (con valores máximos de pico de 20 nm que equivalen a un peso molecular de 730 kDa), éstas no pueden observarse en el gel electroforético (límite 200 kDa).

La asociación de β–lg en presencia de KO y KLVF en condiciones (de concentración y pH) donde dicha proteína se encuentra en estado dimérico, se puede atribuir a fenómenos de volúmenes de exclusión a pH 7, donde ambos biopolímeros se encuentran con igual carga neta. A pH 7, existe una interacción repulsiva entre proteína y polisacárido ya que tanto la proteína como los polisacáridos están cargados negativamente. La presencia de una interacción repulsiva entre proteínas y polisacáridos conduce a un aumento del potencial químico, o en otras palabras, de la actividad termodinámica de la proteína en solución *(Tolstoguzov, 1997a)*.

La separación de fases de proteínas y polisacáridos ocurre por encima de una concentración crítica, pero es importante destacar que en ninguno de los sistemas estudiados se observó separación macroscópica de fases. A estas bajas concentraciones, la β–lg y el PGA coexistirían en una fase única donde los biopolímeros existen en dominios los cuales se excluyen mutuamente unos a otros (sistema *a* de la **Figura 10** de la **Introducción**). Esta situación aumenta la actividad termodinámica de cada uno y aumenta la "concentración efectiva" de cada biopolímero, lo que resulta en cambios específicos sobre las propiedades funcionales, aumentando así la ocurrencia de fenómenos que se darían a mayores concentraciones *(Carp, Barholomai, Relkin & Pilosof, 2001; Tolstoguzov, 1997b)*. Una consecuencia de esto es la aceleración del proceso de agregación *(Capron, Nicolai & Durand, 1999; Ould Eleya & Turgeon, 2000)*.

Además, es importante resaltar que el alginato de propilenglicol es un polisacárido lineal que contiene grupos carboxilo. La incompatibilidad termodinámica disminuye en el siguiente orden: polisacáridos con grupos carboxilo > polisacáridos neutros > polisacáridos con grupos sulfato; además los polisacáridos lineales son más incompatibles con las proteínas que los polisacáridos ramificados *(Grinberg & Tolstoguzov, 1997)*. Por lo tanto, el PGA sería un

polisacárido que provoca gran incompatibilidad con las proteínas. Esto explicaría además, el comportamiento más "efectivo" del KLVF comparado con KO, ya que el primero tiene un menor grado de esterificación lo cual provoca que este polisacárido tenga más grupos carboxilo disponibles para producir la repulsión con la proteína, aumentando el efecto de volúmenes de exclusión.

No obstante los cambios observados en la determinación de tamaño de partícula (**Figuras II.1.2**, **II.1.3** y **II.1.4**) podrían deberse a la formación de complejos β–lg:PGA. Estos complejos podrían generarse por atracciones electrostáticas débiles entre grupos carboxilo del PGA y regiones cargadas positivamente de la β–lg *(Dickinson, 1993)*; sin embargo, debido a lo antes mencionado es más probable que en estas condiciones se favorezca más la incompatibilidad termodinámica que la interacción entre estos dos biopolímeros.

II.1.1.2. Agregación inducida por calor de mezclas de β–lg:KO.

A partir de los resultados obtenidos anteriormente, se decidió seleccionar las soluciones mixtas β–lg:KO para estudiar el efecto del tratamiento térmico sobre ellas, debido a que los sistemas mixtos con KLVF sometidos a tratamiento térmico formaron agregados tan grandes que escapaban del rango de medición del equipo.

La **Figura II.1.6** muestra el cambio del *d(H)* promedio con la temperatura de calentamiento para todos los sistemas mixtos (método de cumulantes). En esta figura se encontraron diferencias importantes en el valor del *d(H)* promedio para los sistemas mixtos β–lg:KO a temperatura ambiente (25 °C) debido a que la sola presencia del polisacárido promueve la asociación de β–lg aún sin calentamiento como se mostró previamente en las **Figuras II.1.2**, **II.1.4** y **II.1.5**.

Se puede observar un gran incremento del *d(H)* promedio con el aumento de la concentración de KO, alcanzando valores más altos para los sistemas mixtos con la mayor concentración de proteína (6 % p/p) (**Figura II.1.6B**). El aumento en el valor del *d(H)* promedio en los sistemas mixtos ocurrió a temperaturas más altas que para la solución de β–lg sola, y esa temperatura fue cercana a la T_o obtenida para el sistema mixto β–lg:PGA (72,4 °C) reportado por *Baeza & Pilosof (2002)*. Al final del calentamiento (80 – 85 °C) las diferencias en el valor del *d(H)* promedio fueron mucho más grandes que al principio del calentamiento.

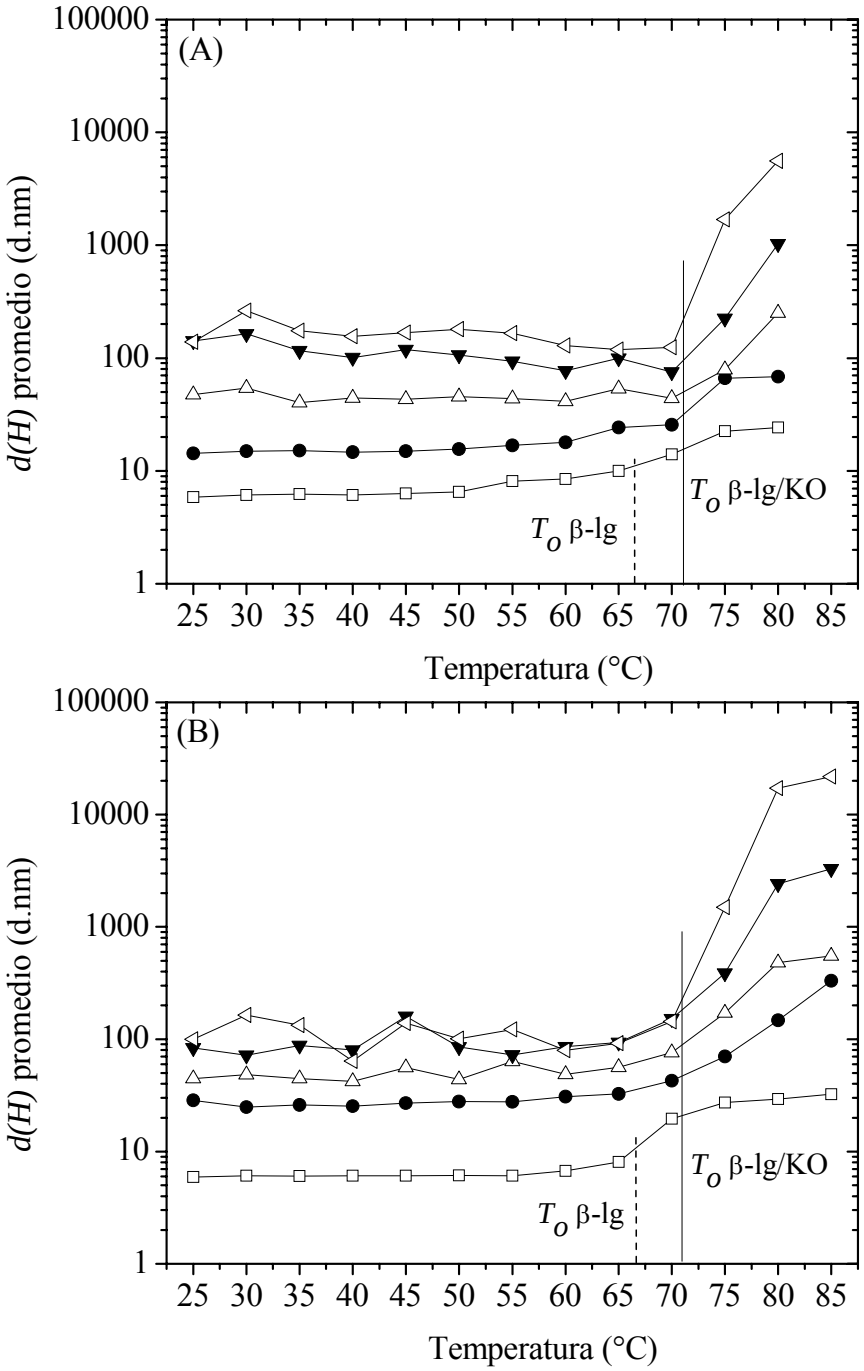


Figura II.1.6. *d(H)* promedio en función de la temperatura de sistemas mixtos β–lg:KO con (A) 3 % p/p y (B) 6 % p/p de proteína a pH 7. Concentración de KO (% p/p): (□) 0, (●) 0,5, (△) 1, (▼) 1,5, (◁) 2. Las T_o de β–lg (de este trabajo) y β–lg:KO *(Baeza & Pilosof, 2002)* se indican con línea punteada y sólida, respectivamente.

Respecto al análisis de las distribuciones durante el calentamiento, en la **Figura II.1.7** se muestran, a modo de ejemplo, las distribuciones de tamaño de partícula por intensidad y volumen de las sistemas mixtos β–lg:KO con la menor concentración de proteína (3 % p/p).

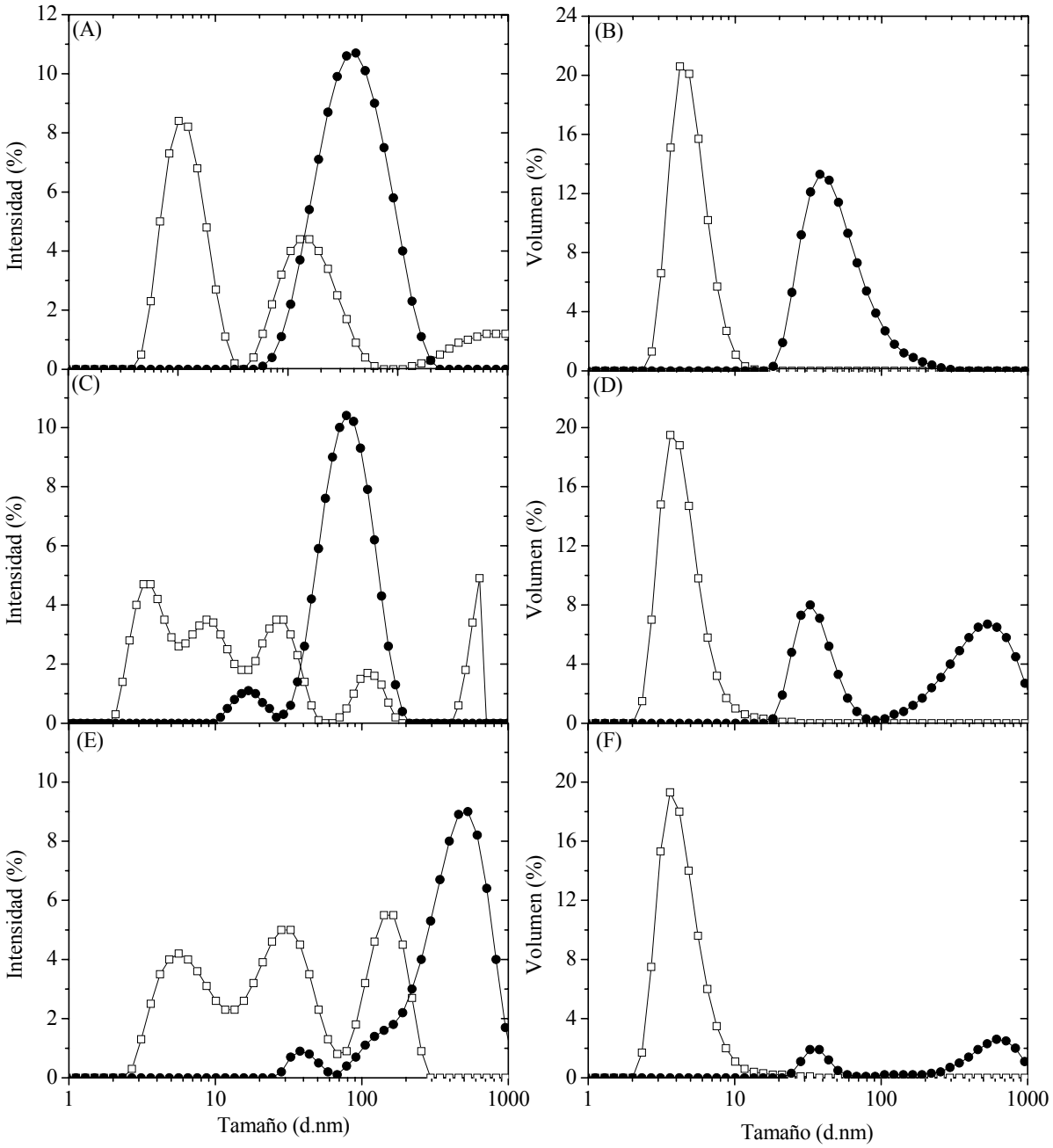


Figura II.1.7. Distribución de tamaño de partícula por intensidad (A, C, E) y volumen (B, D, F) de mezclas de β–lg:KO con 3 % p/p de proteína y diferentes concentraciones de KO (% p/p): (A, B) 0,5; (C, D) 1 y (E, F) 1,5. Temperatura: (□) 25 °C y (●) 80 °C, pH 7.

El comportamiento de los sistemas mixtos a 25 °C en esta figura se presenta con el fin de comparar las distribuciones antes y después del tratamiento térmico.
En las distribuciones tanto de intensidad como de volumen a 80 °C, se observa la formación de agregados (30 – 200 nm) y la desaparición del pico de menor tamaño correspondiente a β–lg a todas las concentraciones de polisacárido evaluadas (**Figura II.1.7**).

En los sistemas con 6 % p/p se observó un comportamiento similar aunque con presencia de agregados más grandes (resultados no mostrados). Las mediciones de los sistemas con mayor concentración de polisacárido presentaron formación de partículas de tamaños mayores a los límites de detección del equipo. Estos grandes agregados generan una gran dispersión que resulta en numerosos errores en el análisis de Contin. Este comportamiento se puede relacionar con la velocidad de agregación la cual es mayor a altas concentraciones de ambos biopolímeros. *Hoffmann, Roefs, Verheul, van Mil & de Kruif (1996)* encontraron un aumento en la velocidad del proceso de agregación de la β–lg con el aumento de la concentración proteica desde 1,5 a 10 % p/p. Además, *Baeza, Gugliotta & Pilosof (2001)* informaron que cantidades crecientes de PGA aumentan la formación de partículas grandes y aceleran el proceso de agregación, lo que está de acuerdo con los resultados presentados en esta sección. Este comportamiento puede explicarse por una incompatibilidad termodinámica más pronunciada entre ambos biopolímeros a altas concentraciones de PGA.

El comportamiento de mezclas de proteínas y polisacáridos se ha estudiado ampliamente con el objetivo de explicar los fenómenos de agregación y gelificación.
Baeza, Gugliotta & Pilosof (2001) estudiaron el proceso de agregación de β–lg en presencia de PGA, calentando los sistemas a una temperatura fija y encontraron que tanto el *d(H)* como el promedio de la intensidad de dispersión (I_s) aumentaron con la concentración de PGA (entre 0,25 y 1 % p/p) lo que coincide con los resultados presentados en este trabajo. En otro estudio, *Baeza, Gugliotta & Pilosof (2003)* encontraron que la presencia de PGA en soluciones de β–lg promovió la formación de grandes agregados que continuaron creciendo en el tiempo. Un comportamiento similar se observó para ese polisacárido y también para λ–carragenano y goma xántica, dando mayores tamaños de los agregados de β–lg para los sistemas mixtos con los polisacáridos con mayor peso molecular y mayor capacidad de adsorción de agua *(Baeza & Pilosof, 2002)*. *Fitzsimons, Mulvihill & Morris* (2008)

encontraron que las interacciones segregativas en sistemas mixtos de WPI y goma guar (una fase única) promovió la agregación de las proteínas del suero desnaturalizadas y que la velocidad y la extensión de la agregación aumentó con el aumento de la concentración de goma guar. Después del calentamiento de sistemas mixtos de pectina y proteínas del suero también se observaron diferentes distribuciones de peso molecular y un aumento en el tamaño promedio de los agregados *(Beaulieu, Corredig, Turgeon, Wicker & Doublier, 2005)*.

Aymard, Gimel, Nicolai & Durand (1996) mostraron que la agregación térmica de β–lg a pH 7 y 0,1 M de fuerza iónica sigue un mecanismo de dos etapas: i) formación de agregados globulares pequeños, ii) asociación de estos pequeños glóbulos en agregados más grandes. En un trabajo posterior *(Capron et al., 1999)* investigaron la agregación térmica de β–lg en presencia de κ–carragenano y encontraron que la primer etapa del mecanismo antes descripto no fue afectada por la presencia de κ–carragenano pero sí lo fue la agregación de los pequeños glóbulos (segunda etapa), la cual fue acelerada en presencia del polisacárido (aumentando el *d(H)* de los agregados de 76 nm sin κ–carragenano hasta 150 nm en presencia del polisacárido). Una de las razones que los autores propusieron para explicar este comportamiento fue la existencia de una separación de microfases entre los grandes agregados de β–lg y κ–carragenano lo que aumentaría la concentración local de la proteína y por lo tanto su cinética de agregación, y sugirieron que probablemente otros polisacáridos podrían provocar el mismo efecto. En efecto, *Zhang & Foegeding (2003)* observaron un efecto similar sobre la agregación de β–lg con el agregado de κ–carragenano y también con ι–carragenano estudiando por técnicas turbidimétricas, pero no encontraron ese efecto con el agregado de λ–carragenano y dextrano sulfato. Ellos explicaron sus observaciones en términos de una más alta densidad de carga del κ–carragenano y del ι–carragenano lo que podría inducir una repulsión más fuerte entre los carragenanos y la proteína con una aceleración de la asociación atractiva de la proteína. Como se mencionó anteriormente, la incompatibilidad disminuye en el orden: polisacáridos con grupos carboxilo > polisacáridos neutros > polisacáridos con grupos sulfato; además, los polisacáridos lineales son más incompatibles con proteínas que los polisacáridos ramificados *(Grinberg & Tolstoguzov, 1997)*. Los carragenanos son polisacáridos lineales con diferentes contenidos de grupos sulfato: κ–carragenano (25 %), ι–carragenano (30 %) y λ–carragenano (35 %). El dextrano sulfato, una derivación aniónica del dextrano, es un polisacárido ramificado aleatoriamente.

Estas características podrían explicar los diferentes comportamientos encontrados por *Zhang & Foegeding (2003)* respecto a la diferentes características estructurales de los polisacáridos al igual que los resultados obtenidos por *Capron et al. (1999)* sobre la agregación de β–lg en presencia de κ–carragenano. De este modo, κ–carragenano y ι–carragenano generaron una más alta incompatibilidad con β–lg promoviendo la agregación de esta proteína. Del mismo modo, el comportamiento de KO presentado en esta sección, como el de otros alginatos *(Baeza et al., 2001; Baeza et al., 2003; Baeza & Pilosof, 2002)* que mostraron efecto similar sobre la agregación de dicha proteína, puede atribuirse al hecho de que los alginatos son polisacáridos lineales con grupos carboxilo en su estructura lo que promovería una alta incompatibilidad.

II.1.2. Referencias.

Aymard, P., Gimel, J. C., Nicolai, T., & Durand, D. (1996). Experimental evidence for a two-step process in the aggregation of β-lactoglobulin at pH 7. *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, *93*, 987-997.

Baeza, R. I., Gugliotta, L. M., & Pilosof, A. M. R. (2001). Heat induced aggregation of β-lactoglobulin in the presence of non gelling polysaccharides studied by dynamic light scattering. *Proceedings of EMPROMER 2001*, *3*, 1513-1518.

Baeza, R. I., Gugliotta, L. M., & Pilosof, A. M. R. (2003). Gelation of β-lactoglobulin in the presence of propylene glycol alginate: kinetics and gel properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *31*, 81-93.

Baeza, R. I., & Pilosof, A. M. R. (2002). Calorimetric studies of thermal denaturation of β-lactoglobulin in the presence of polysaccharides. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, *35*, 393-399.

Beaulieu, M., Corredig, M., Turgeon, S. L., Wicker, L., & Doublier, J.-L. (2005). The formation of heat-induced protein aggregates in whey protein/pectin mixtures studied by size exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering detection. *Food Hydrocolloids*, *19*, 803-812.

Capron, I., Nicolai, T., & Durand, D. (1999). Heat induced aggregation and gelation of β-lactoglobulin in the presence of κ-carrageenan. *Food Hydrocolloids*, *13*, 1-5.

Carp, D. J., Barholomai, G. B., Relkin, P., & Pilosof, A. M. R. (2001). Effects of denaturation on soy protein–xanthan interactions: comparison of a whipping–rheological and a bubbling method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *21*, 163-171.

Dickinson, E. (1993). Protein-polysaccharide interactions in food colloids. En: E. Dickinson, & P. Walstra, *Food Colloids and polymers: stability and mechanical properties* (pp. 77-93). Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.

Doublier, J. L., & Launay, B. (1981). Rheology of galactomannan solutions: comparative study of guar gum and locust bean gum. *Journal of Texture Studies*, *12*, 151-172.

Fitzsimons, S. M., Mulvihill, D. M., & Morris, E. R. (2008). Large enhancements in thermogelation of whey protein isolate by incorporation of very low concentrations of guar gum. *Food Hydrocolloids*, *22*, 576-586.

Grinberg, V. Y., & Tolstoguzov, V. B. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*, *11*, 145-158.

Hoffmann, M. A. M., Roefs, S. P. F. M., Verheul, M., van Mil, P. J. J. M., & de Kruif, K. G. (1996). Aggregation of β-lactoglobulin studied by in situ light scattering. *Journal of Dairy Research*, *63*, 423-440.

Ould Eleya, M. M., & Turgeon, S. L. (2000). Rheology of κ-carrageenan and β-lactoglobulin mixed gels. *Food Hydrocolloids*, *14*, 29-40.

Tolstoguzov, V. (1997a). Multicomponent biopolymer gels. *Food Hydrocolloids*, *11*, 159-170.

Tolstoguzov, V. (1997b). Protein-polysaccharide interactions. En: S. Damodaran, & A. Paraf, *Food proteins and their applications* (pp. 171-198). New York: Marcel Dekker.

Zhang, G., & Foegeding, A. (2003). Heat-induced phase behavior of β-lactoglobulin/polysaccharide mixtures. *Food Hydrocolloids*, *17*, 785-792.

SECCIÓN II

Capítulo 2

Interacciones entre proteínas lácteas y polisacáridos en geles

II.2. Interacciones proteína–polisacárido en geles.

Las interacciones proteína–polisacáridos en sistemas gelificados han sido estudiadas ampliamente en numerosos sistemas *(Baeza, Carp, Pérez & Pilosof, 2002; Baeza, Gugliotta & Pilosof, 2001; Baeza, Gugliotta & Pilosof, 2003; Beaulieu, Turgeon & Doublier, 2001; Bertrand & Turgeon, 2007; Bryant & McClements, 2000; Capron, Nicolai & Durand, 1999; Mleko, Li-Chan & Pickus, 1997; Neiser, Draget & Smidsrod, 2000; Ould Eleya & Turgeon, 2000a; Ould Eleya & Turgeon, 2000b; Pérez, Wargon & M.R. Pilosof, 2006)*.

En este capítulo se estudiaron los sistemas mixtos β–lg:PGA a pH 7. En un trabajo previo *(Baeza & Pilosof, 2001)* se observó que los polisacáridos no gelificantes (como son los PGA) en condiciones de limitada compatibilidad termodinámica pueden modificar la cinética de agregación de β–lg, el tamaño de los agregados de β–lg y el grado de asociación de las partículas en el gel y que determinando las condiciones de composición (tanto de proteína como de polisacárido) y pH es posible obtener geles con propiedades muy variadas, entre ellos los geles débiles con estructura "untable" (spreadable) que son importantes para diferentes aplicaciones.

A partir de los resultados obtenidos en el trabajo mencionado antes y con el objetivo de obtener geles débiles, las condiciones elegidas fueron las siguientes:

- ✓ La concentración de β–lg (de la firma Besnier & Bridel) en los sistemas mixtos fue 5, 7 y 9 % p/p (concentraciones menores a la crítica necesaria para gelificar a pH 7).
- ✓ Los PGA estudiados fueron: MAN, KO y KLVF. La concentración de las tres variedades de PGA fue constante (1,25 % p/p).

II.2.1. Gelificación de sistemas mixtos β–lg:PGA a pH 7.

Como se vio en el capítulo anterior, la presencia de PGA promueve la asociación/agregación de la proteína. Por lo tanto, es de esperar que ese comportamiento se vea reflejado en la apariencia y propiedades reológicas de los geles.

En las soluciones de β–lg 5, 7 y 9 % p/p, sin agregado de PGA, no se observó cruce entre el módulo elástico (*G'*) y el módulo viscoso (*G''*), indicando que no se produjo gelificación en estas concentraciones de β–lg.

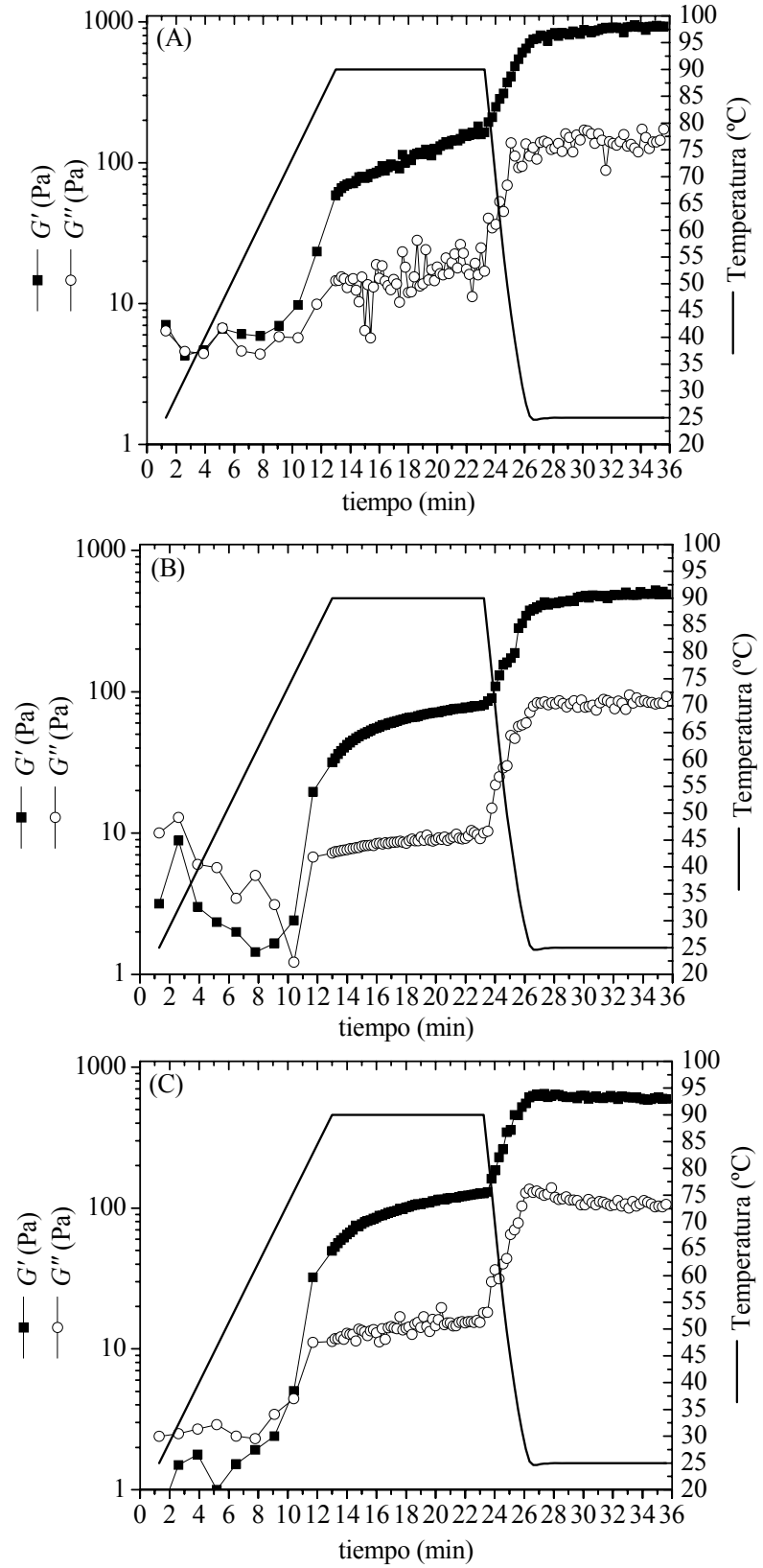


Figura II.2.1. Evolución de (■) *G'* y (○) *G''* en función del tiempo y (–) evolución de la temperatura de sistemas mixtos β–lg 9 % p/p – PGA 1,25 % p/p a pH 7.

Variedad de PGA: (A) KLVF, (B) KO, (C) MAN.

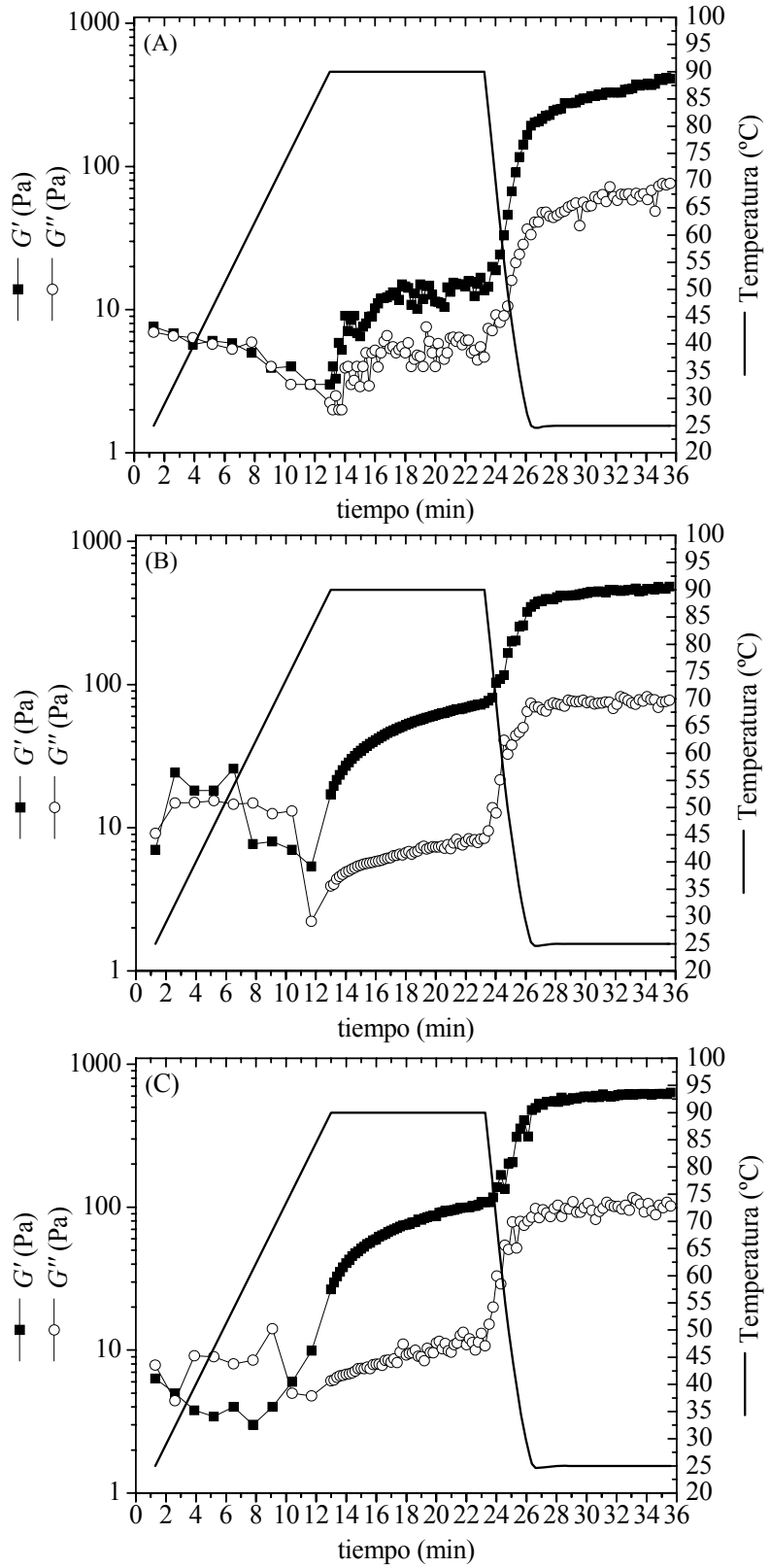


Figura II.2.2. Evolución de (■) *G'* y (○) *G''* en función del tiempo y (–) evolución de la temperatura de sistemas mixtos β–lg 7 % p/p:PGA 1,25 % p/p a pH 7.
Variedad de PGA: (A) KLVF, (B) KO, (C) MAN.

En los sistemas mixtos con 9 o 7 % p/p de β–lg se observó gelificación en presencia de todos los PGA estudiados (**Figura II.2.1** y **II.2.2A**).

En cambio, para los sistemas mixtos con 5 % p/p de β–lg sólo se observó gelificación en presencia de KLVF (**Figura II.2.3**).

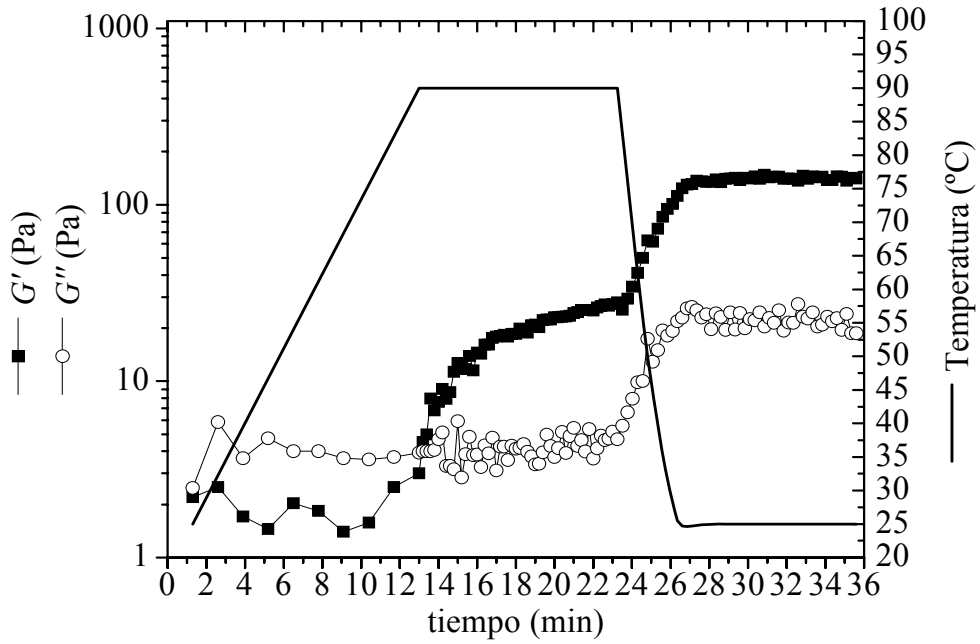


Figura II.2.3. Evolución de (■) *G'* y (○) *G''* en función del tiempo y (–) evolución de la temperatura del sistema mixto β–lg 5 % p/p – KLVF 1,25 % p/p, pH 7.

Es importante resaltar que en todos estos sistemas la gelificación se da a concentraciones de β–lg mucho menores que la crítica, que a este pH es de 12 % p/p.

En la **Figura II.2.4** se muestran los valores de *G'* obtenidos al final del enfriamiento para todos los sistemas mixtos gelificados. Los mayores valores de *G'* al finalizar el enfriamiento para los sistemas mixtos con la mayor concentración de proteína (9 % p/p) se obtuvieron en presencia de KLVF, luego le siguen los geles obtenidos en presencia de MAN y por último los sistemas mixtos con KO. Este orden se corresponde con los valores de grado de esterificación y viscosidad mostrados en la **Tabla 7** de **Materiales y Métodos**, donde KLVF presentó el menor grado de esterificación entre los tres polisacáridos lo que se relaciona con una mayor cantidad de cargas disponibles para repeler a la proteína aumentando la

incompatibilidad entre ambos biopolímeros. Además, este PGA es el que presenta la mayor viscosidad, relacionado con un mayor peso molecular. En los sistemas mixtos con 7 % p/p de proteína no se observaron grandes diferencias entre los valores finales de *G'*, mostrando el siguiente orden: MAN > KO > KLVF.

En todos los casos, los valores de *G'* obtenidos son bajos comparados por ejemplo con los obtenidos en el **Capítulo 2** de la **Sección I** lo que proporciona la apariencia untable buscada para estos geles.

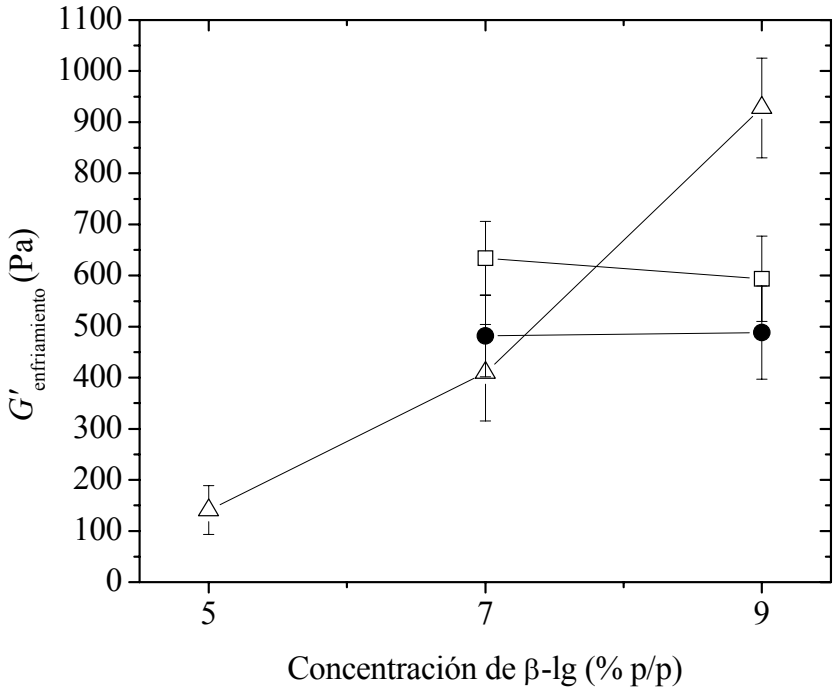


Figura II.2.4. *G'* al finalizar el enfriamiento en función de la concentración de β–lg para sistemas mixtos β–lg:PGA con 1,25 % p/p de PGA. Variedad de PGA: (□) MAN, (●) KO, (△) KLVF. Temperatura 25 ºC, pH 7.

Con respecto a los valores de *tan δ* todos fueron bajos indicando una gran viscoelasticidad relativa en los geles (**Figura II.2.5**). Se encontraron valores ligeramente más bajos, es decir mayor viscoelasticidad relativa, para la solución con 5 % p/p de proteína en presencia de KLVF. El valor de *tan δ* es un parámetro obtenido a partir de la relación entre los valores de *G''* y *G'* de los geles, por eso a pesar de que este sistema mixto fue el que presentó menor valor de *G'* y *G''*, la relación entre ambos presenta el menor valor por lo cual tiene una mayor viscoelasticidad relativa que los demás sistemas mixtos.

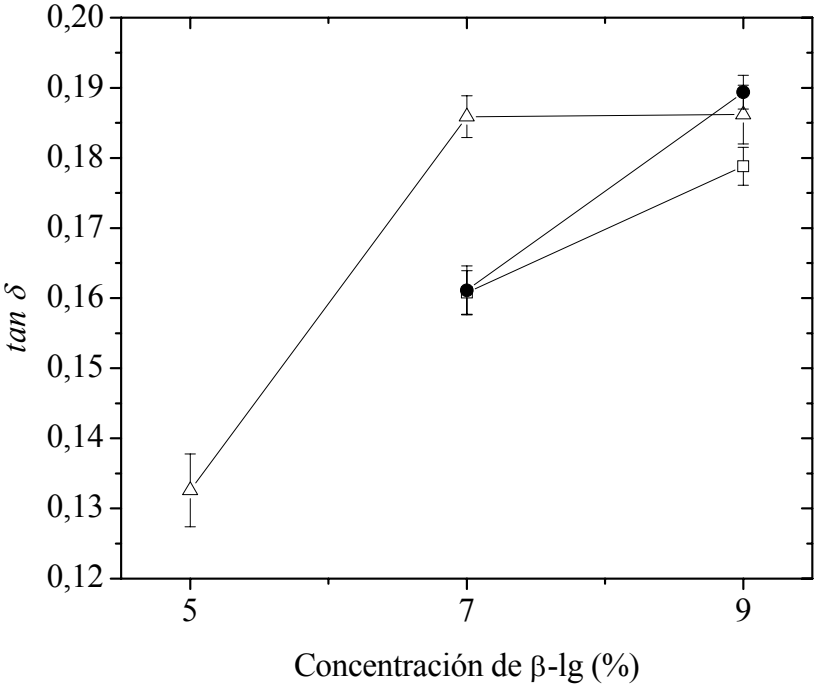


Figura II.2.5. Dependencia de *tan δ* al finalizar el enfriamiento con la concentración de β–lg para sistemas mixtos β–lg:PGA con 1,25 % p/p de PGA. Variedad de PGA: (□) MAN, (●) KO, (△) KLVF. Temperatura 25 ºC, pH 7.

A partir del cruce entre *G'* y *G''* en los reogramas (**Figuras II.2.1, II.2.2** y **II.2.3**) se obtuvo la temperatura de gelificación de cada sistema (**Figura II.2.6**).

Puede observarse que la temperatura de gelificación (T_{gel}) para los sistemas mixtos β–lg:KO y β–lg:MAN fue similar con una tendencia a disminuir con el aumento de la concentración de β–lg. En dicho casos la T_{gel} de los sistemas mixtos (entre 72 y 82,8 °C) resultó menor que la correspondiente a β–lg sola al 15 % p/p (89 °C).

El resultado más notable en la evaluación de la T_{gel} se observó para los sistemas mixtos β–lg:KLVF en los cuales se observó una enorme disminución de la T_{gel} con la concentración de proteína variando desde 90 ºC a 46,7 ºC.

La misma tendencia se observó al analizar la velocidad de gelificación (V_{gel}) (**Figura II.2.7**) obtenida a partir de la inversa del tiempo de gelificación (t_{gel}), donde se observa una mayor velocidad en los sistemas con mayor concentración de proteína y principalmente en presencia de KLVF.

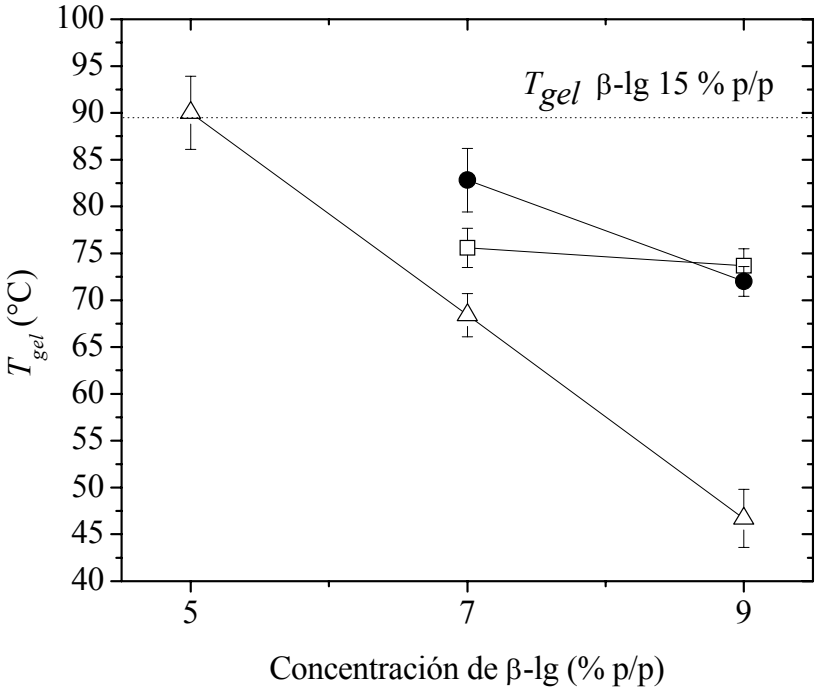


Figura II.2.6. T_{gel} (ºC) en función de la concentración de β–lg (% p/p) para los sistemas mixtos β–lg:PGA con 1,25 % p/p de PGA. Variedad de PGA: (□) MAN, (●) KO, (△) KLVF. Con línea punteada se indica la T_{gel} de β–lg al 15 % p/p, pH 7.

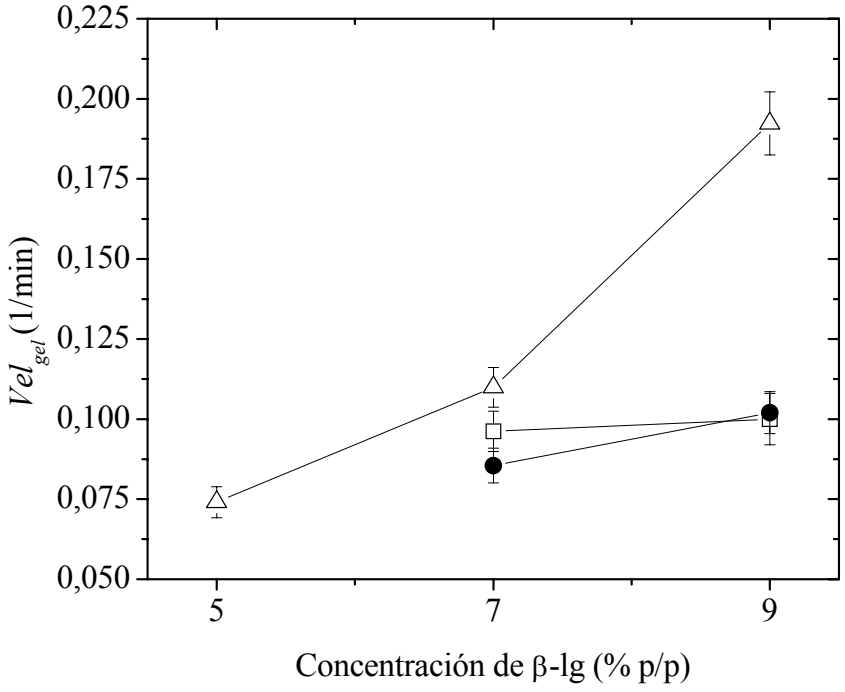


Figura II.2.7. V_{gel} (1/min) en función de la concentración de β–lg para sistemas mixtos β–lg:PGA con 1,25 % p/p de PGA. Variedad de PGA: (□) MAN, (●) KO, (△) KLVF, pH 7.

El hecho de que la proteína gelifique en presencia de los alginatos de propilenglicol, en concentraciones donde observamos que la proteína sola no gelificaba demuestra que existe un efecto sinérgico en estos sistemas mixtos. Este efecto sinérgico se puede atribuir principalmente al fenómeno de "volúmenes de exclusión" y a que los PGA son uno de los grupos de polisacáridos que presentan gran incompatibilidad con las proteínas debido a su conformación lineal y a la presencia de grupos carboxilo en su estructura. Estos dos efectos pueden resultar en cambios específicos sobre las propiedades funcionales *(Carp, Barholomai, Relkin & Pilosof, 2001; Tolstoguzov, 1997)* y en la posibilidad de controlar y mejorar las propiedades de los geles. Una consecuencia de esto es la disminución de la concentración crítica para la gelificación y de la temperatura de gelificación como se ha mostrado en este trabajo.

Para verificar la existencia de un comportamiento segregativo debido a la incompatibilidad termodinámica entre la β–lg y los diferentes PGA se sometió a estos sistemas mixtos a una fuerza centrífuga con el objetivo de determinar la ocurrencia de separación de fases a temperatura ambiente. Todos los sistemas mixtos con KO y MAN se separaron en dos fases luego de 5, 7 y 9 h para los sistemas con 5, 7 y 9 % p/p de β–lg, respectivamente, una fase superior rica en polisacárido y una inferior rica en proteína cuyas concentraciones de proteína y polisacárido se muestran en la **Tabla II.2.1**.
Los sistemas mixtos con KLVF no se separaron lo cual se puede explicar por la mayor viscosidad que presenta este polisacárido en solución *(Baeza, 2003; Baeza, Carrera Sánchez, Pilosof & Rodríguez Patino, 2004)*, es decir por un impedimento cinético.

Se observa en la **Tabla II.2.1** que la fase rica en polisacáridos es la fase que presentó mayor volumen por lo cual se puede deducir que la mezcla se presenta como una emulsión (agua en agua) donde las moléculas de proteína se encuentran dispersas en una fase continua de PGA.
Cuando estos sistemas se someten a calentamiento para su gelificación, la fase rica en proteína gelifica. La fase continua rica en PGA, sin embargo, contiene cantidades apreciables de proteína (2,9 a 5,6 %) por lo cual durante el calentamiento puede adquirir cierta consistencia debido a la agregación de la proteína presente. Esta estructura es consistente con la textura "untable" de estos geles y su bajo valor de *G'*.

Tabla II.2.1. Concentración de proteína (PR) y polisacárido (PS) en las fases inferior (FI) y superior (FS) de los sistemas mixtos luego de centrifugados.

Sistema	Fase	% PR	% PS
β–lg 5 % – MAN 1,25 %	FI	6,2	1,1
	FS	3,4	1,3
β–lg 7 % – MAN 1,25 %	FI	8,8	1,0
	FS	4,5	1,3
β–lg 9 % – MAN 1,25 %	FI	11,6	1,0
	FS	5,4	1,4
β–lg 5 % – KO 1,25 %	FI	10,8	0,9
	FS	2,9	1,3
β–lg 7 % – KO 1,25 %	FI	14,3	0,8
	FS	4,1	1,3
β–lg 9 % – KO 1,25 %	FI	15,7	1,0
	FS	5,6	1,3

Numerosos autores encontraron una mejora en las propiedades funcionales en mezclas de proteínas y polisacáridos *(Baeza et al., 2002; Baeza et al., 2003; Baeza & Pilosof, 2001; Kampf & Nussinovitch, 1997; Mleko et al., 1997; Neiser et al., 2000; Ould Eleya & Turgeon, 2000b; Schorsch, Jones & Norton, 2000)* y la principal causa del efecto sinérgico encontrado fue también la incompatibilidad termodinámica entre los diferentes biopolímeros.

Además de éste han sido observados otros comportamientos en mezclas de proteínas y polisacáridos. *Fitzsimons, Mulvihill & Morris (2008)* estudiaron el comportamiento de sistemas mixtos de WPI y goma guar con concentraciones de proteína del 3 % p/p y encontraron que el agregado de bajas concentraciones de goma guar aumentaba el valor del módulo elástico del gel, sin embargo concentraciones mayores provocaban una disminución de este valor, lo que fue atribuido a una excesiva agregación de la proteína (con una precipitación incipiente) con lo cual el gel finalmente colapsaba.

Es importante resaltar también, que la presencia de KLVF induce la gelificación de la proteína a concentraciones menores que los otros PGA, lo que podría ser debido a su mayor viscosidad y menor grado de esterificación, que promueve una mayor incompatibilidad termodinámica con la proteína como fue discutido en el capítulo anterior de esta sección.

II.2.2. Referencias.

Baeza, R. (2003). Interacciones entre β-lactoglobulina y polisacáridos en coloides alimentarios. *Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. PhD* (p. 253). Buenos Aires, Argentina.

Baeza, R. I., Carp, D. J., Pérez, O. E., & Pilosof, A. M. R. (2002). κ-carrageenan-protein interactions: effect of proteins on polysaccharide gelling and textural properties. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, *35*, 741-747.

Baeza, R. I., Carrera Sánchez, C., Pilosof, A. M. R., & Rodríguez Patino, J. M. (2004). Interfacial and foaming properties of propylenglycol alginates. Effect of degree of esterification and molecular weight. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *36*, 139-145.

Baeza, R. I., Gugliotta, L. M., & Pilosof, A. M. R. (2001). Heat induced aggregation of β-lactoglobulin in the presence of non gelling polysaccharides studied by dynamic light scattering. *Proceedings of EMPROMER 2001*, *3*, 1513-1518.

Baeza, R. I., Gugliotta, L. M., & Pilosof, A. M. R. (2003). Gelation of β-lactoglobulin in the presence of propylene glycol alginate: kinetics and gel properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *31*, 81-93.

Baeza, R. I., & Pilosof, A. M. R. (2001). Mixed biopolymer gel system of β-lactoglobulin and non-gelling gums. En: E. Dickinson, & R. Miller, *Food Colloids. Fundamentals* (pp. 392-403): The Royal Society of Chemistry.

Beaulieu, M., Turgeon, S. L., & Doublier, J. L. (2001). Rheology, texture and microstructure of whey proteins/low methoxyl pectins mixed gels with added calcium. *International Dairy Journal*, *11*, 961-967.

Bertrand, M.-E., & Turgeon, S. L. (2007). Improved gelling properties of whey protein isolate by addition of xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, *21*(2), 159-166.

Bryant, C. M., & McClements, D. J. (2000). Influence of xanthan gum on physical charactersitics of heat-denatured whey protein solutions and gels. *Food Hydrocolloids*, *14*, 383-390.

Capron, I., Nicolai, T., & Durand, D. (1999). Heat induced aggregation and gelation of β-lactoglobulin in the presence of κ-carrageenan. *Food Hydrocolloids*, *13*, 1-5.

Carp, D. J., Barholomai, G. B., Relkin, P., & Pilosof, A. M. R. (2001). Effects of denaturation on soy protein–xanthan interactions: comparison of a whipping–rheological and a bubbling method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *21*, 163-171.

Fitzsimons, S. M., Mulvihill, D. M., & Morris, E. R. (2008). Large enhancements in thermogelation of whey protein isolate by incorporation of very low concentrations of guar gum. *Food Hydrocolloids*, *22*, 576-586.

Kampf, N., & Nussinovitch, A. (1997). Rheological characterization of κ-carrageenan soy milk gels. *Food Hydrocolloids*, *11*(3), 261-269.

Mleko, S., Li-Chan, E. C. Y., & Pickus, S. (1997). Interactions of κ-carrageenan with whey proteins in gels formed at different pH. *Food Research International*, *30*(6), 427-433.

Neiser, S., Draget, K. I., & Smidsrod, O. (2000). Gel formation in heat-treated bovine serum albumine-κ-carrageenan systems. . *Food Hydrocolloids*, *14*, 95-110.

Ould Eleya, M. M., & Turgeon, S. L. (2000a). The effects of pH on the rheology of β-lactoglobulin/κ-carrageenan mixed gels. *Food Hydrocolloids*, *14*, 245-251.

Ould Eleya, M. M., & Turgeon, S. L. (2000b). Rheology of κ-carrageenan and β-lactoglobulin mixed gels. *Food Hydrocolloids*, *14*, 29-40.

Pérez, O. E., Wargon, V., & M.R. Pilosof, A. (2006). Gelation and structural characteristics of incompatible whey proteins/hydroxypropylmethylcellulose mixtures. *Food Hydrocolloids*, *20*(7), 966-974.

Schorsch, C., Jones, M. G., & Norton, I. T. (2000). Phase behaviour of pure micellar casein κ-carrageenan systems in milk salt ultrafiltrate. *Food Hydrocolloids*, *14*, 347-358.

Tolstoguzov, V. (1997). Protein-polysaccharide interactions. En: S. Damodaran, & A. Paraf, *Food proteins and their applications* (pp. 171-198). New York: Marcel Dekker.

SECCIÓN II

Capítulo 3

Interacciones entre proteínas lácteas y polisacáridos en interfases

II.3. Propiedades interfaciales de polisacáridos y sus mezclas con CMP.

En este capítulo se estudiaron las propiedades interfaciales de los sistemas mixtos CMP:polisacáridos (KO, GX y λ–C). Se caracterizó en primer lugar al KO solo. El CMP fue estudiado individualmente en el **Capítulo 3** de la **Sección I**. Por último, se evaluaron los sistemas mixtos CMP:KO, CMP:GX y CMP:λ–C.

Las condiciones elegidas para este estudio fueron las siguientes:

- ✓ Para determinar la isoterma de adsorción de KO, se utilizaron soluciones a concentración entre 10^{-4} y 1 % p/p a pH 5 y 7.
- ✓ Para determinar la interacción de los polisacáridos con el CMP se prepararon mezclas a una concentración fija de polisacárido de 0,5 % y variable del CMP en el rango de concentraciones entre 5 x 10^{-7} y 5 % a pH 5 y 7.

II.3.1. Isotermas de adsorción.

II.3.1.1. Isoterma de adsorción de KO en la interfase aire–agua.

En la **Figura II.3.1** se muestra el efecto de la concentración de KO sobre la presión superficial de equilibrio a pH 5 y 7. Al igual que con las proteínas (visto en el **Capítulo 3** de la **Sección I**) y también como otros polisacáridos *(Pérez, Carrera Sanchez, Rodríguez Patino & Pilosof, 2006)* se consideró el equilibrio en la presión superficial después de 24 h.

El comportamiento observado para las soluciones de KO a ambos valores de pH fue sigmoideo, el cual es típico de biopolímeros con actividad superficial y surfactantes como fue explicado en la sección antes mencionada. El valor de la presión superficial aumentó con la concentración de KO en todo el rango de concentración estudiado.

A los dos valores de pH estudiados, el KO mostró actividad superficial desde una concentración de 1 x 10^{-4} % p/p. Se observó un mayor valor de π a pH 5 en todo el rango de concentración estudiado, aunque en las concentraciones más altas los valores fueron similares. La mayor actividad superficial a pH 5 se atribuye a una menor carga neta negativa de KO al disminuir el pH lo cual facilitaría la adsorción de mayores cantidades de KO en la interfase.

El valor de presión superficial aumentó levemente desde 1 x 10^{-4} a 1 x 10^{-2} % p/p y a partir de esta última concentración se observó un aumento importante de la presión superficial con el aumento de la concentración de KO pero sin alcanzar un plateau, incluso a concentraciones de 1 % p/p. Ese aumento importante de la presión superficial en las soluciones de KO a concentraciones mayores al 1 x 10^{-2} % p/p se observa como un punto de inflexión tanto en la isoterma a pH 5 como a pH 7. Como se mencionó en el **Capítulo 3** de la **Sección I**, el punto de inflexión en las isotermas π–C se relaciona con la transición de una estructura expandida a una más condensada *(Graham & Philips, 1979; Pérez et al., 2006)*. De esta manera, a concentraciones menores a 1 x 10^{-2} (presiones superficiales menores a 9,5 y 5,3 para las soluciones a pH 5 y 7, respectivamente) el KO adoptaría una estructura expandida (*estructura I*) y a concentraciones mayores adoptaría una conformación más condensada (*estructura II*). Como se mencionó anteriormente no se alcanzó el plateau, indicando la ausencia de saturación de la monocapa *(Álvarez Gómez & Rodríguez Patino, 2006; Pérez, Carrera Sánchez, Rodríguez Patino & Pilosof, 2007)*.

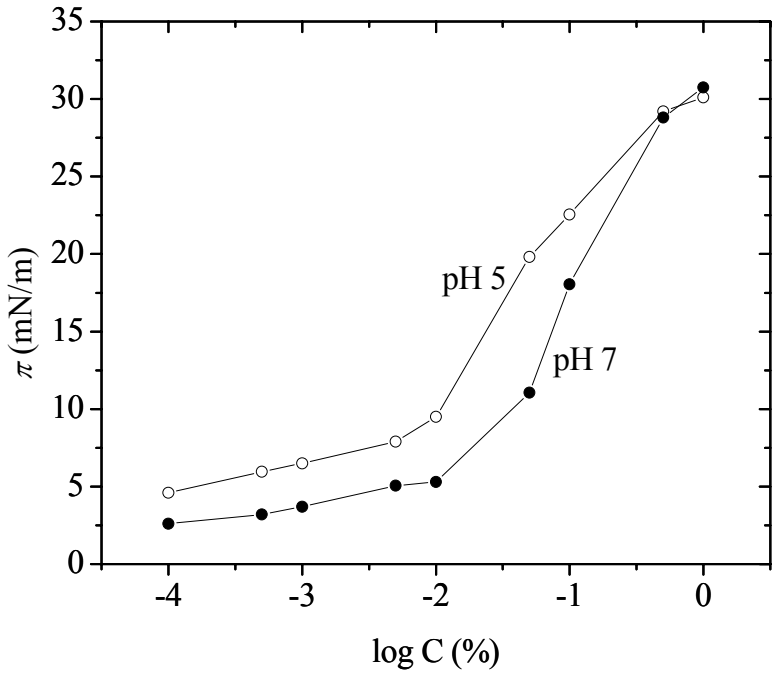


Figura II.3.1. Isoterma de adsorción de KO. Temperatura 20 ºC, pH (●) 7 y (○) 5. I = 0,05 M.

II.3.1.2. Isoterma de adsorción de mezclas CMP–polisacáridos.

Se estudiaron las interacciones CMP:KO en la interfase aire–agua por tensiometría en sistemas mixtos con cantidad fija de KO (0,5 % p/p) y variable de CMP entre 5 x 10^{-6} y 4 % p/p. La **Figura II.3.2** muestra las isotermas de adsorción de estos sistemas a pH 7 y 5.

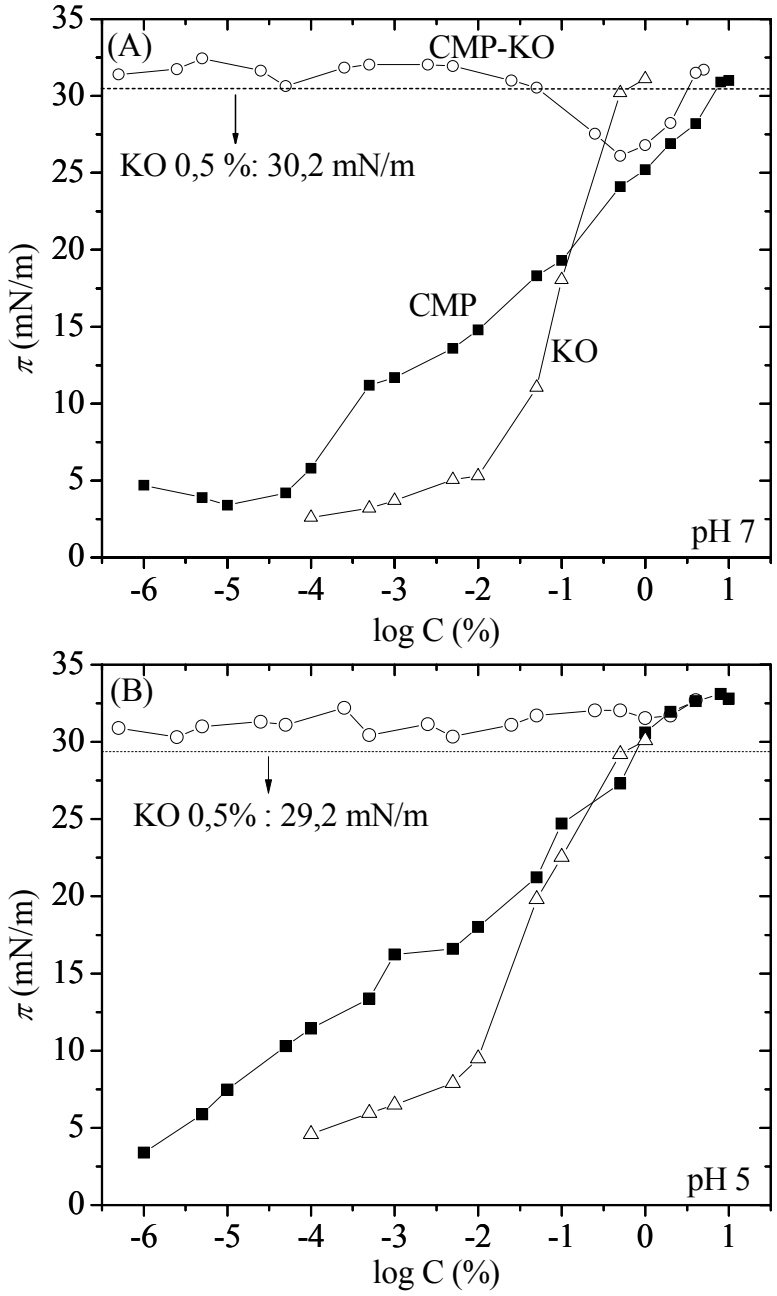


Figura II.3.2. Isoterma de adsorción a pH (A) 7 y (B) 5 de las mezclas (○) CMP:KO (log C corresponde a CMP). Se muestran las isotermas de (■) CMP y (△) KO con el objetivo de comparación y se indica con línea de puntos el valor de presión superficial de KO al 0,5 % que es la concentración en que se encuentra en los sistemas mixtos. Temperatura 20 ºC y I = 0,05 M.

Se puede observar que KO determinó la actividad superficial en los sistemas mixtos con concentraciones de CMP menores a 0,5 y 1 % p/p para las isotermas a pH 7 y 5, respectivamente, aunque los valores de presión superficial en los sistemas mixtos a ambos pH fueron superiores al valor de la solución de KO al 0,5 % p/p que es la concentración a la que se encuentra en los sistemas mixtos. Por otro lado, en los sistemas mixtos con concentraciones de CMP iguales o mayores de 0,5 % p/p a pH 7 y 1 % p/p a pH 5 la actividad superficial fue determinada por el CMP, ya que a partir de dichas concentraciones este péptido determinó el ascenso de la presión superficial de los sistemas mixtos dando valores muy semejantes a las soluciones de CMP solo a cada pH.

Estos resultados sugieren que existiría una concentración crítica de CMP en los sistemas mixtos a cada pH, por encima de la cual el comportamiento de los mismos está dominado por este péptido, lo cual indicaría una adsorción competitiva entre el CMP y KO.

También se determinaron las isotermas de adsorción a pH 7 y 5 de las mezclas CMP:GX y CMP:λ–C en la interfase aire–agua (**Figura II.3.3** y **Figura II.3.4**, respectivamente) en sistemas mixtos con cantidad fija de GX o λ–C (0,5 % p/p) y variable de CMP entre 5 x 10^{-6} y 4 %.

Se sabe que GX y λ–C no se adsorben en la interfase aire–agua *(Carp, 2001; Yilmazer, Carrillo & Kokini, 1991)* por la ausencia de grupos hidrofóbicos en su estructura. Sin embargo en las **Figuras II.3.3** y **II.3.4** se indica con línea de puntos el valor de presión superficial obtenido para ambos polisacáridos puros al 0,5 % p/p y se observa que presentan actividad superficial. Este comportamiento puede explicarse debido a la presencia de contaminantes en dichas muestras de polisacáridos *(Dickinson, 2003)*.

Se ha observado que la presencia de impurezas de proteína (2 – 3 %) en muestras de polisacáridos sin actividad interfacial, otorga propiedades tensioactivas a las soluciones, pudiendo éstas ser eliminadas al remover esas impurezas proteicas de las muestras *(Baeza, 2003; Huang, Kakuda & Cui, 2001)*. De hecho el análisis del contenido de proteína del λ–C mostró que presenta 1,25 % p/p de proteína, aunque de todas maneras λ–C no tiene capacidad para formar espumas a 0,5 % p/p de concentración *(Martínez, 2007)*.

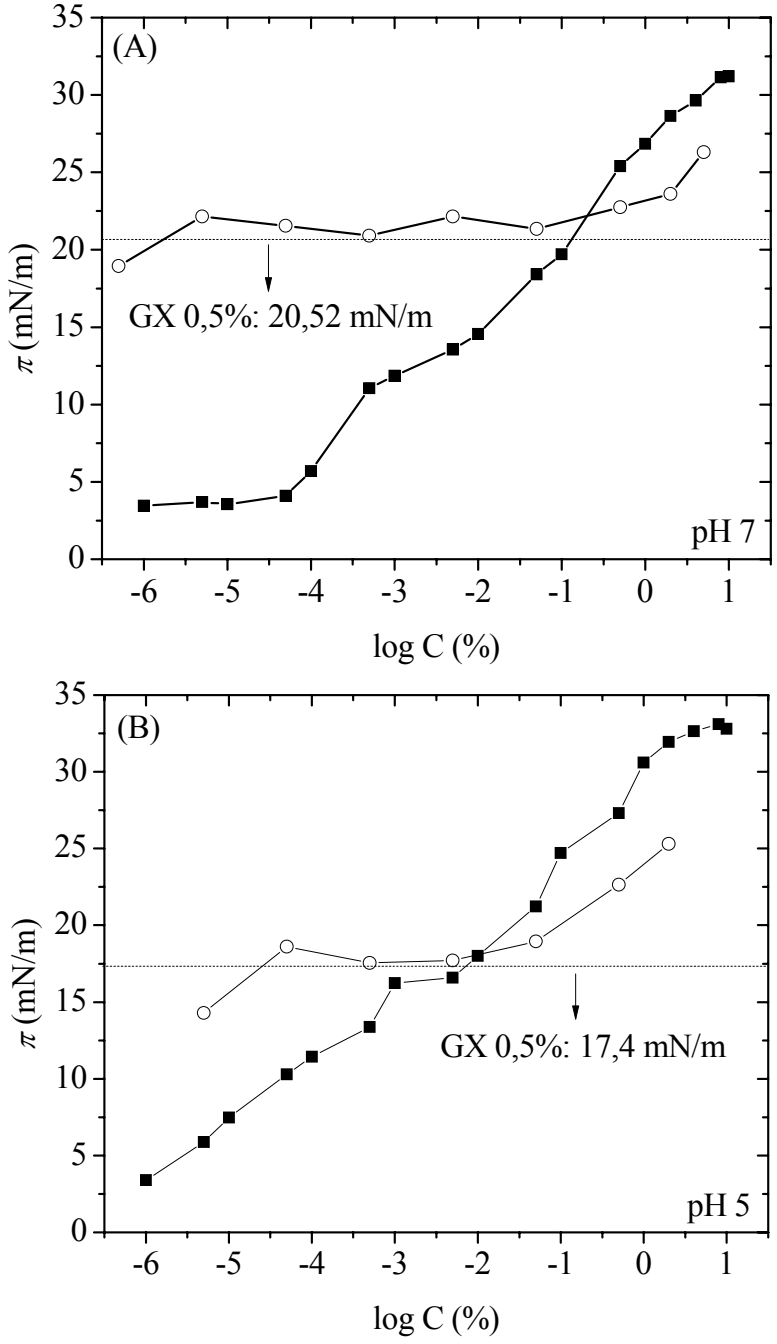


Figura II.3.3. Isoterma de adsorción a pH (A) 7 y (B) 5 de las mezclas (○) CMP:GX. Se muestran las isotermas de (■) CMP a cada pH con el objetivo de comparación y se indica con línea de puntos el valor de presión superficial de GX al 0,5 % que es la concentración en que se encuentra en los sistemas mixtos. Temperatura 20 ºC y I = 0,05 M.

En los sistemas mixtos CMP:GX (**Figura II.3.3**) se observa que tanto a pH 7 como a 5 GX domina la presión superficial de los sistemas mixtos por debajo de una concentración de 10^{-1} o 10^{-2} % p/p de CMP respectivamente a pH 7 y 5. Por encima de esta concentración se

manifiesta un comportamiento competitivo ya que la π comienza a crecer conforme aumenta la concentración de CMP en la solución.

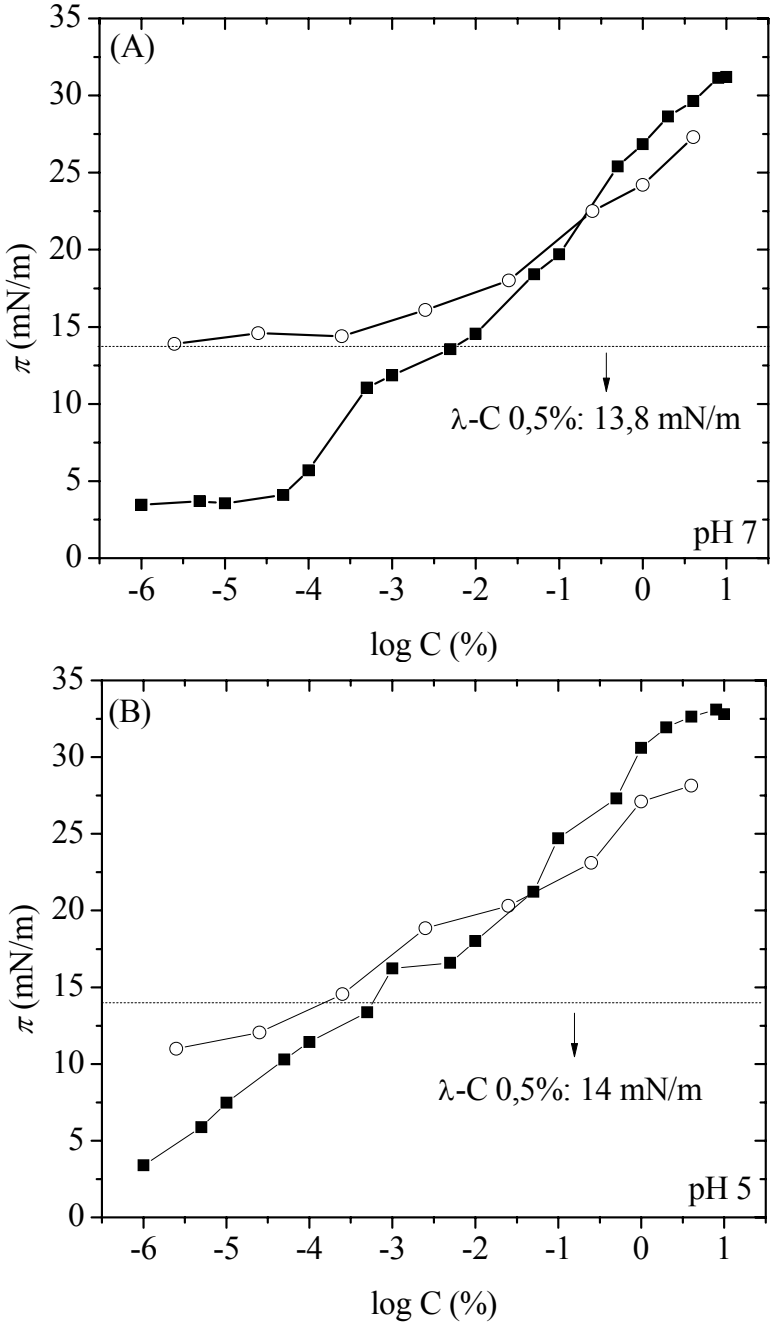


Figura II.3.4. Isoterma de adsorción a pH (A) 7 y (B) 5 de las mezclas (○) CMP:λ–C. Se muestran las isotermas de (■) CMP a cada pH con el objetivo de comparación y se indica con línea de puntos el valor de presión superficial de λ–C al 0,5 % que es la concentración en que se encuentra en los sistemas mixtos. Temperatura 20 ºC y I = 0,05 M.

Con respecto a las isotermas de adsorción de los sistemas mixtos CMP:λ–C se observa que a pH 7 (**Figura II.3.4A**) y a concentraciones de CMP menores a 5 x 10^{-3} % p/p el polisacárido determina el comportamiento interfacial de la mezcla con valores muy semejantes al del polisacárido solo. Por otro lado, a concentraciones mayores a dicho valor la actividad superficial de los sistemas mixtos está dominada por CMP.
A pH 5, la isoterma de adsorción CMP:λ–C presenta una tendencia semejante a la isoterma de CMP solo indicando que a este pH CMP domina la interfase (**Figura II.3.4B**).

Estos resultados indican en primer lugar que en todos los sistemas mixtos estudiados existe una concentración crítica de CMP a partir de la cual este péptido domina el comportamiento interfacial. Dicha concentración crítica es mayor en sistemas mixtos con polisacáridos que presentan actividad superficial, como es el caso del KO. De hecho, en los sistemas mixtos CMP:KO a ambos pH se observa la influencia de CMP recién a partir de que la relación en el sistema mixto es 1:1. En presencia de polisacáridos activos superficialmente predominan los efectos competitivos entre los dos biopolímeros, salvo a muy bajas concentraciones de ambos biopolímeros *(Pérez et al., 2007)*.

Para los sistemas mixtos CMP:GX y CMP:λ–C, la concentración a la que CMP domina la actividad superficial de los sistemas mixtos es mucho menor, lo que se puede explicar debido al hecho de que estos polisacáridos no son tensioactivos (aunque se observa cierto valor de presión superficial debido a la presencia de contaminantes). El contaminante podría competir con la proteína por la interfase como ocurre en la presencia de surfactantes de bajo peso molecular *(Mackie, Gunning, Wilde & Morris, 1999; Rodríguez Patino, Rodríguez Niño & Carrera Sánchez, 2003)*.
Se observa que los contaminantes asociados a λ–C presentan un bajo carácter tensioactivo ya que en los sistemas mixtos dominó prácticamente CMP. Sin embargo, los contaminantes de GX mostraron mayor actividad superficial.
Además, cabe destacar que a pH 5 la concentración crítica de CMP para dominar la interfase fue menor que a pH 7 para los sistemas mixtos en presencia de estos dos polisacáridos (GX y λ–C). Este comportamiento con el pH es el esperado debido a que el CMP a pH 5 mostró mayor actividad superficial que a pH 7 en un amplio rango de concentración (**Figura I.3.4** del **Capítulo 3** de la **Sección I**) lo cual fue explicado por el hecho de que a pH 5, las moléculas de

CMP están más cerca de su pI *(Kreuß, Strixner & Kulozik, 2009)* presentando menor repulsión electrostática que a pH 7 lo que permite una mayor adsorción a la interfase aire–agua.

II.3.2. Cinética de adsorción.

La evolución de la presión superficial con el tiempo para los sistemas mixtos CMP:polisacáridos fueron determinados por un tensiómetro automático de gota a pH 7, a una concentración de CMP de 4 % p/p y de polisacárido de 0,5 % p/p donde se manifestaron efectos competitivos (apartado **II.3.1** de esta sección).

La presión superficial (π) del sistema mixto CMP:KO se muestra en la **Figura II.3.5**. En la misma figura se presenta a modo comparativo la evolución de la presión superficial con el tiempo para los componentes solos (CMP y KO) a la concentración en que se presentan en la mezcla.

La presión superficial aumentó inmediatamente después de la formación de la gota lo cual está asociado con la adsorción de la proteína *(Damodaran & Song, 1988; Graham & Phillips, 1979; MacRitchie & Alexander, 1963)* y/o el polisacárido *(Baeza, Carrera Sánchez, Pilosof & Rodríguez Patino, 2004; Baeza, Carrera Sánchez, Rodríguez Patino & Pilosof, 2005)*.

Los valores de presión alcanzados por la solución de KO coinciden con otros obtenidos previamente *(Baeza et al., 2004)*.

La existencia de adsorción competitiva entre CMP y KO puede deducirse de la comparación de las curvas *π–tiempo* para los biopolímeros simples y para la mezcla. Debido a que el KO es menos activo superficialmente que el CMP a estas concentraciones, el reemplazo de CMP por KO, en los sistemas mixtos disminuye el valor de la presión superficial.

Se ha reportado adsorción competitiva entre proteínas y agentes tensioactivos de bajo peso molecular como monoglicéridos *(Dickinson, 1992; Rodríguez Patino et al., 2003)*, lecitinas *(Courthaudon, Dickinson & Christie, 1991)*, surfactantes *(Mackie et al., 1999; Mackie, Gunning, Wilde & Morris, 2000)* y biopolímeros tensioactivos como alginatos de propilenglicol *(Baeza et al., 2005)*.

La adsorción competitiva entre biopolímeros puede afectar en forma directa a la presión superficial por desplazamiento de la proteína por un polisacárido con tensioactividad y en

forma indirecta por incompatibilidad termodinámica entre las macromoléculas adsorbidas en la interfase que podrían aumentar la concentración aparente superficial *(Martínez, 2007)*. De hecho, existe evidencia de separación de fases de macromoléculas en las películas mixtas en la interfase aire–agua *(Sengupta, Razunovsky & Damodaran, 2000)*.

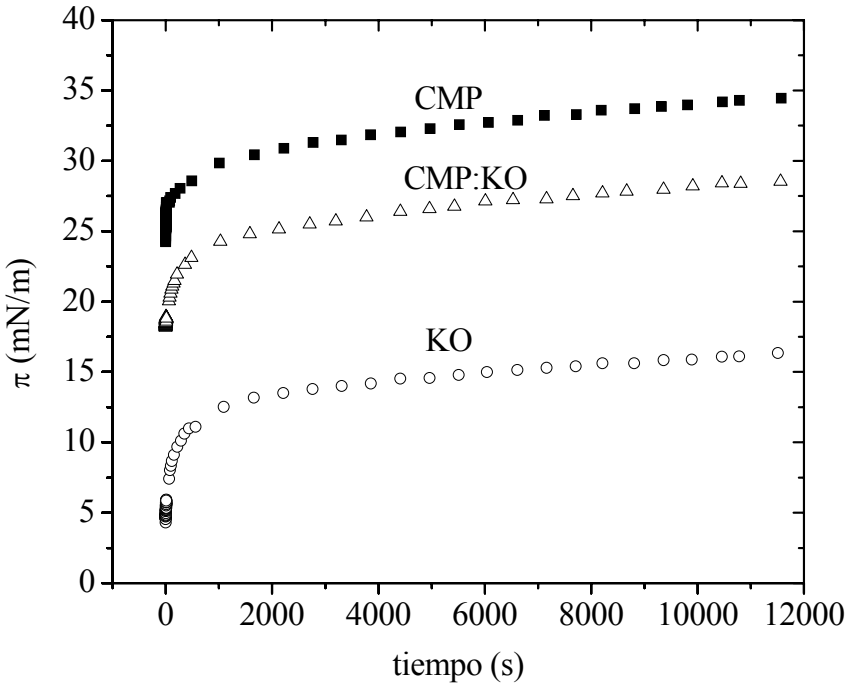


Figure II.3.5. Variación de la presión superficial (π) en función del tiempo para los sistemas (■) CMP 4 % p/p, (○) KO 0,5 % p/p y (△) CMP:KO en concentración 4 % p/p:0,5 % p/p , adsorbidas en la interfase aire–agua. Temperatura 20 ºC, pH 7 y I = 0,05 M.

De la misma manera se evaluó la evolución de la presión superficial para los sistemas mixtos CMP:GX y CMP:λ–C y los resultados se muestra en las **Figura II.3.6**.

Al igual que lo observado en la **Figura II.3.5** la presión superficial aumentó inmediatamente después de la formación de la gota en los sistemas puros y mixtos de la **Figura II.3.6**, lo cual en estos polisacáridos es debido a la presencia de contaminantes.

A partir de los resultados obtenidos hasta aquí, se decidió continuar el estudio de interfase sólo con los sistemas mixtos en presencia de KO, ya que la presencia de contaminantes en las muestras de GX y λ–C interferiría en la interpretación de los resultados de comportamiento interfacial de sus sistemas mixtos con CMP.

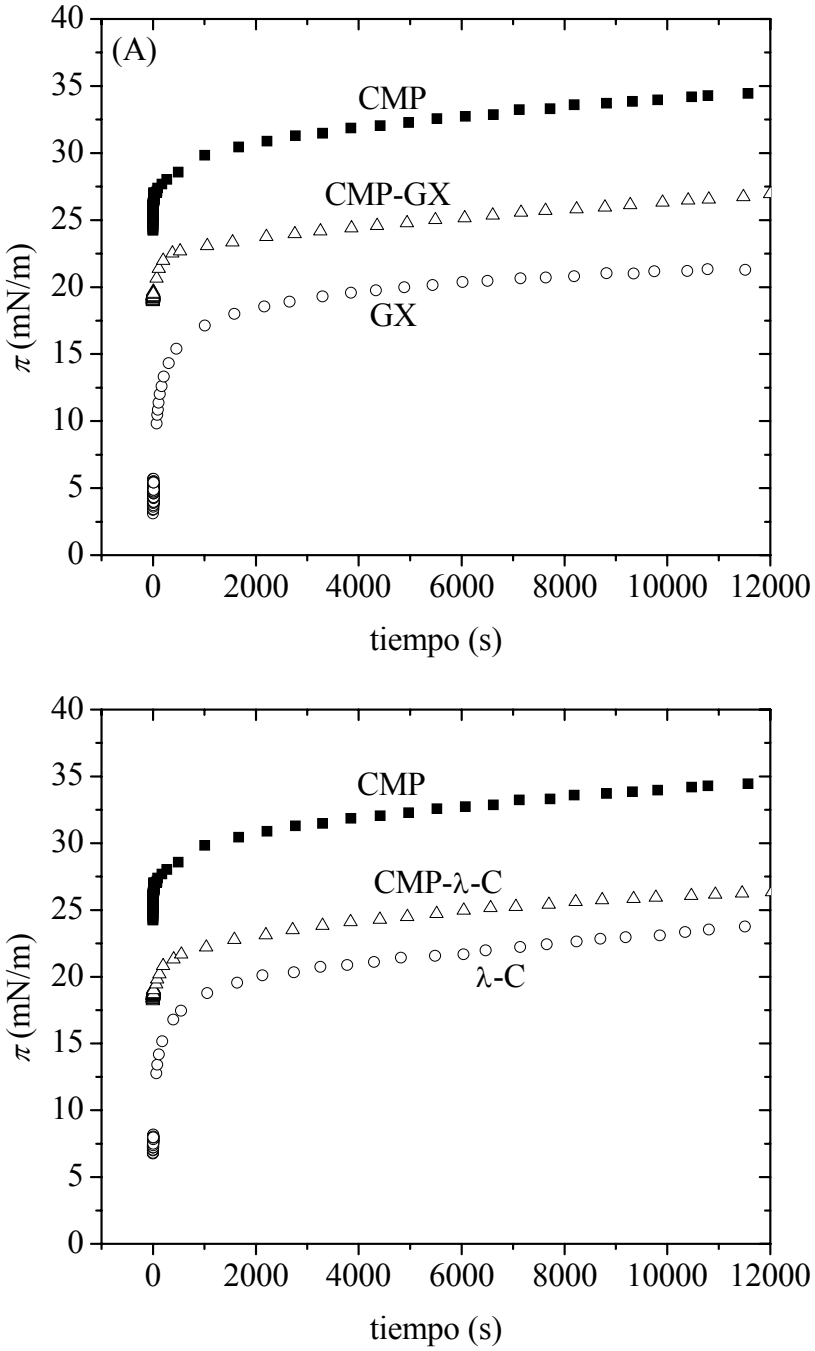


Figura II.3.6. Variación de la presión superficial (π) en función del tiempo para los sistemas (■) CMP 4 % p/p, (○) polisacárido (0,5 % p/p y (△) CMP:polisacárido en concentración 4 % p/p : 0,5 % p/p , adsorbidas en la interfase aire–agua. (A) En presencia de GX y (B) en presencia de λ–C. Temperatura 20 ºC, pH 7 y I = 0,05 M.

Como ya fue mencionado, la cinética de adsorción a la interfase aire–agua se puede monitorear por medio de cambios en la presión superficial (π) con el tiempo.

La **Figura II.3.7** describe el cambio en la presión superficial con el tiempo durante la primera etapa de adsorción del KO y su mezcla con CMP. El análisis de la solución de CMP solo fue previamente descripto en la **Figura I.3.6** del **Capítulo 3** de la **Sección I** pero se incluye en el gráfico con el propósito de comparación.

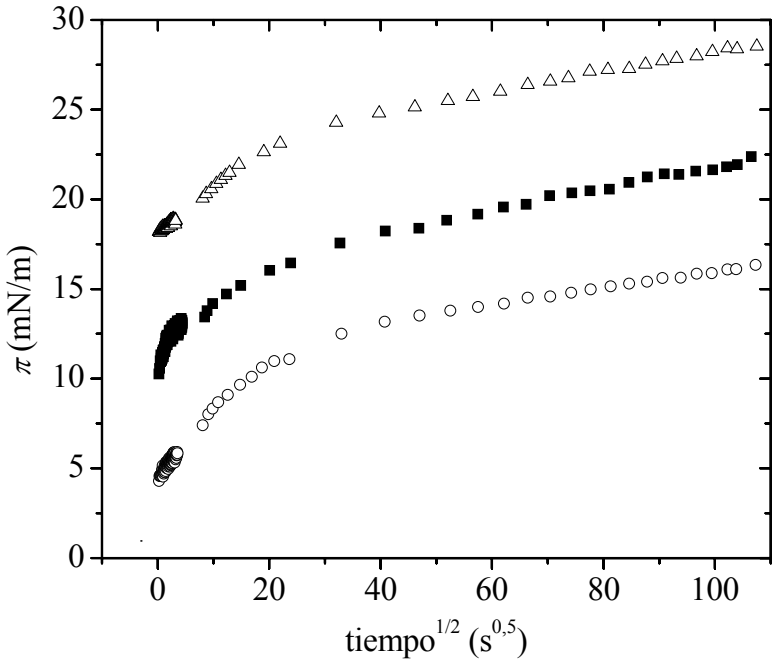


Figura II.3.7. Dependencia de la presión superficial con el tiempo de películas de (■) CMP, (○) KO y (△) el sistema mixto CMP:KO adsorbidas a la interfase aire–agua de acuerdo a la velocidad de difusión a pH 7. Concentración de KO solo y en el sistema mixto: 0,5 % p/p, concentración de CMP solo y en el sistema mixto: 4 % p/p. Temperatura 20 ºC, I = 0,05 M.

Para la solución de KO, en la primer etapa pudo utilizarse la ecuación de *Ward & Tordai (1946)* (**ecuación 9** de **Materiales y Métodos**) ya que la π fue menor a 10 mN/m, mientras que para el CMP (como se mostró en la **Tabla I.3.2**) y para el sistema mixto CMP:KO no puede calcularse mediante dicha ecuación sino como el valor de la pendiente del primero punto. En este último caso se puede sugerir que la cinética de adsorción del sistema mixto CMP:KO hacia la interfase aire–agua, a diferencia de la solución de KO solo, no está controlada por la etapa de difusión.

En la **Tabla II.3.1** se muestran los valores de la K_{dif} para los tres sistemas obtenidos a partir de los gráficos π vs $tiempo^{1/2}$.

Tabla II.3.1. Valores de la constante de difusión del CMP, KO y la mezcla CMP:KO en la interfase aire–agua, a 20 ºC, pH 7 y fuerza iónica 0,05 M.

CMP:β–lg	K_{dif} $(mN\ m^{-1}\ s^{-0,5})$*
CMP	> 76,72 ± 1,21[1]
KO	0,3105 ± 0,03875 (0,944)[2]
CMP:KO	> 66,23 ± 3,12[1]

Símbolos: K_{dif}: Constante cinética de difusión. [1] calculado como la pendiente del primer punto, [2] calculado mediante la ecuación de Ward & Tordai (**ecuación 9**), * promedio ± desvío estándar.

Debido a que los valores de K_{dif} fueron obtenidos de diferente manera no es posible comparar los resultados con la solución de KO sola, pero sí entre CMP y el sistema mixto. Estos dos últimos presentaron una muy rápida difusión a la interfase, característico de surfactantes de bajo peso molecular *(Álvarez Gómez & Rodríguez Patino, 2006; Nawar, 1985)*. La velocidad de difusión del CMP fue ligeramente mayor que la del sistema mixtos sugiriendo que la presencia de KO impediría la rápida difusión del CMP a la interfase aire–agua lo que puede deberse a dos razones: i) una competencia entre CMP y KO por la interfase, ii) una interacción entre ambos formando un complejo con menor velocidad de difusión a la interfase.

Por otro lado, como se dijo antes, la cinética de adsorción de KO a la interfase aire–agua está controlada por la etapa de difusión, lo que está de acuerdo con resultados reportados previamente para éste y otros polisacáridos *(Baeza et al., 2004)*.

Luego de la etapa de difusión se utilizó la **ecuación 10** descripta en **Materiales y Métodos** *(Graham & Phillips, 1979; Tornberg, 1978)* para analizar la velocidad de adsorción (penetración) y reordenamiento de las moléculas adsorbidas de proteína, polisacárido o la mezcla de ambos en la interfase aire–agua. En la **Figura II.3.8** se muestra el ajuste de dicha ecuación para la solución de KO y su mezcla con CMP a pH 7. El ajuste de esta ecuación para la solución de CMP solo fue mostrado también previamente en la **Figura I.3.7** del **Capítulo 3** de la **Sección I**.

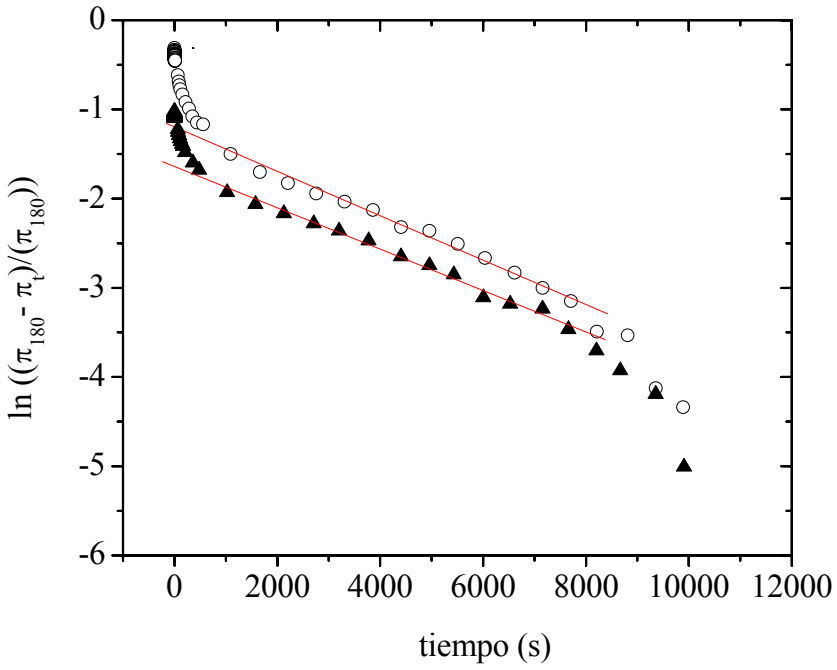


Figura II.3.8. Dependencia de la presión superficial con el tiempo de películas de (○) KO y (▲) CMP:KO adsorbidas de acuerdo a la velocidad de adsorción, despliegue y penetración a la interfase aire–agua a pH 7. Concentración de KO solo y en el sistema mixto: 0,5 % p/p, concentración de CMP en el sistema mixto: 4 % p/p. Temperatura 20 ºC, I = 0,05 M.

En la **Tabla II.3.2** se muestran los valores de las constantes cinéticas obtenidas por medio del análisis descripto (**ecuación 10**).

Tabla II.3.2. Parámetros característicos para la adsorción del CMP, KO y la mezcla CMP:KO en la interfase aire–agua, a 20 ºC, pH 7 y fuerza iónica 0,05 M.

CMP:β–lg	$K_{ads}.10^4$ (s^{-1}) (LR)*	$K_r.10^4$ (s^{-1}) (LR)*
CMP	2,56 ± 0,32 (0,996)	7,62 ± 0,47 (0,94)
KO	2,555 ± 0,0336 (0,9945)	5,651 ± 0,099 (0,984)
CMP:KO	2,5 ± 0,093 (0,9965)	5,075 ± 0,637 (0,9763)

Símbolos: K_{ads}: Constante cinética de adsorción y K_r: constante cinética de reordenamiento. Concentración de CMP y KO solos y en la mezcla: 4 y 0,5 % p/p, respectivamente. * promedio ± desvío estándar.

Respecto a la velocidad de adsorción se obtuvieron valores similares entre los componentes solos y el sistema mixto, mientras que la velocidad de reordenamiento fue notablemente más

rápida para la solución de CMP solo, lo cual puede explicarse en base a la gran flexibilidad de su molécula como fue explicado previamente en el **Capítulo 3** de la **Sección I**. El K_r del sistema mixto sería menor al de CMP reflejando la presencia de KO en la interfase.

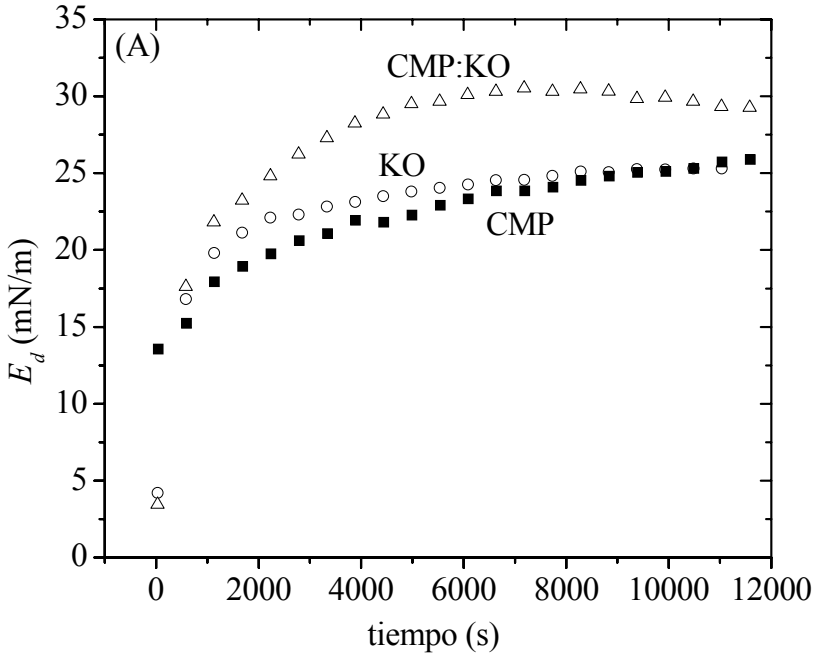
II.3.3. Reología interfacial de KO y sus mezclas con CMP.

En la **Figura II.3.9** se puede observar la variación de las propiedades reológicas superficiales (E_d, E_v y *tan* δ) de las películas interfaciales de CMP, KO y la película interfacial mixta.

Al analizar la componente elástica (**Figura II.3.9A**) se observó que los componentes solos presentaron valores similares de E_d mientras que el sistema mixto presentó un valor superior. Este resultado indica un comportamiento sinérgico entre KO y CMP en relación a la elasticidad de la película.

En el análisis de la componente viscosa se observó que el sistema mixto nuevamente presentó el mayor valor pero en este caso CMP y KO presentaron valores diferentes, siendo mucho mayor el valor de E_v para KO que para CMP (**Figura II.3.9B**).

Sin embargo, al analizar el gráfico de *tan* δ (**Figura II.3.9C**) se observó que el sistema mixto presentó menor viscoelasticidad relativa (mayor valor de *tan* δ) que los componentes solos y un valor similar a KO solo indicando que el polisacárido domina la viscoelasticidad relativa de la película.



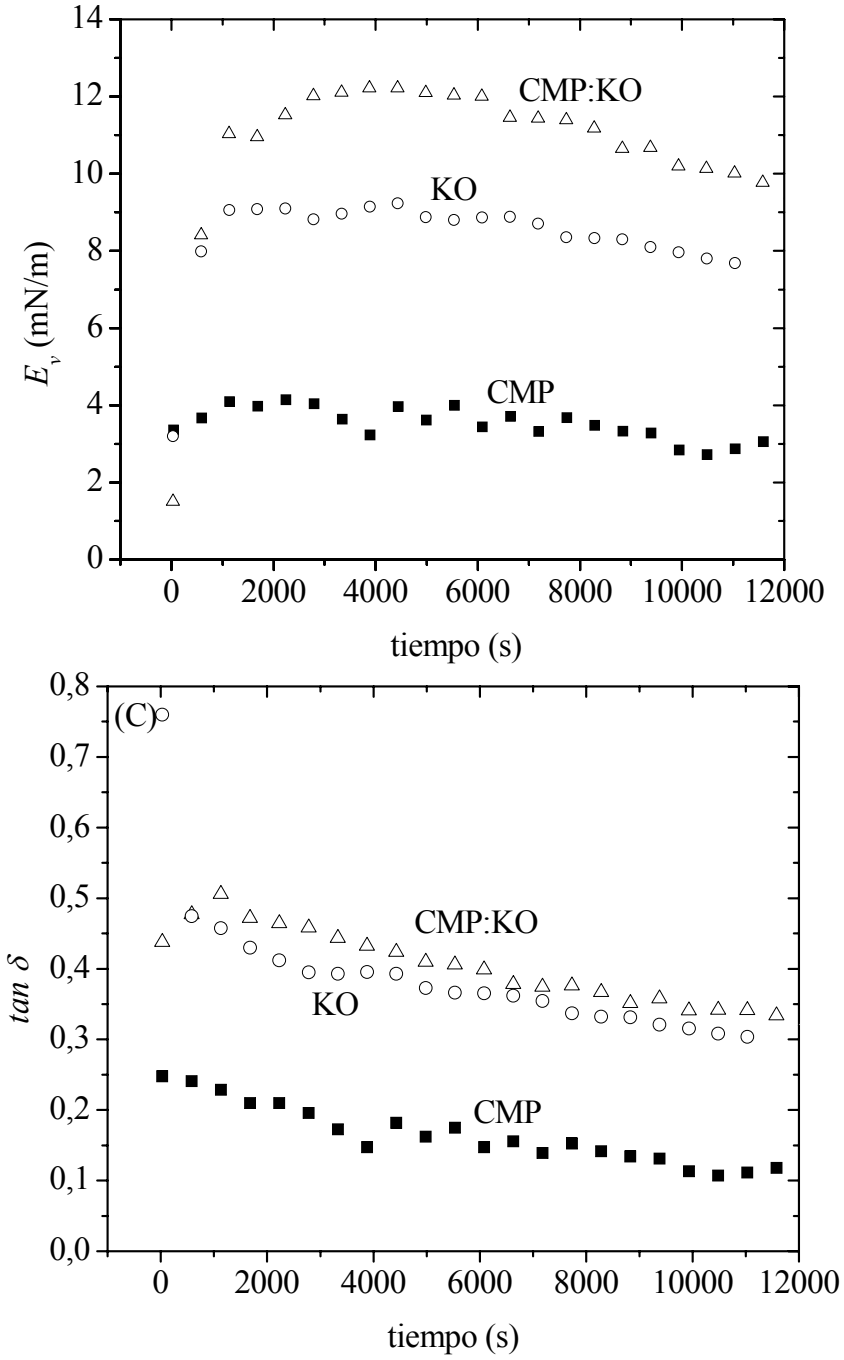


Figura II.3.9. Variación de (A) la elasticidad dilatacional superficial (E_d), (B) la viscosidad dilatacional superficial (E_v) y (C) la tangente del ángulo de fase ($tan\ \delta$), en función del tiempo para las soluciones de (■) CMP, (○) KO y (△) el sistema mixto CMP:KO adsorbidos en la interfase aire–agua. Concentraciones en las soluciones puras y el sistema mixto: 4 y 0,5 % p/p para CMP y KO, respectivamente. Frecuencia: 100 mHz. Amplitud de deformación: 15 %.
Temperatura 20 °C, pH 7, y I = 0,05 M.

Todos los resultados obtenidos a partir de los estudios interfaciales revelan un efecto importante del KO en los sistemas mixtos con CMP. Para explicar los efectos observados, deben considerarse los siguientes fenómenos *(Baeza, 2003)*:

(i) la habilidad de los polisacáridos para adsorberse en la interfase y aumentar la presión superficial,

(ii) la posibilidad de que ocurra complejamiento con la proteína adsorbida en la interfase,

(iii) la existencia de una limitada compatibilidad termodinámica entre proteína y polisacáridos.

La fijación de los polisacáridos en la película superficial puede ocurrir por los mecanismos (i) o (ii), dependiendo de la estructura química de los polisacáridos y el pH del medio. Una vez que los polisacáridos han penetrado o se han complejado en la interfase, los fenómenos de volúmenes de exclusión entre ambos biopolímeros a pH neutro podría llevar a un aumento en el potencial químico o actividad termodinámica de la proteína en la interfase *(Pavlovskaya, Semenova, Thzapkina & Tolstoguzov, 1993)*. Por lo tanto, la proteína en la superficie podría comportarse como si estuviera más concentrada (con una estructura más condensada), llevando a un aumento en la presión superficial. Ha sido demostrado que la adición de goma xántica en soluciones de proteína de soja a pH neutro presenta un comportamiento interfacial similar al observado con un aumento de la concentración de proteína *(Carp, Bartholomai & Pilosof, 1999)*, derivado del efecto de volúmenes de exclusión.

II.3.4. Referencias.

Álvarez Gómez, J. M., & Rodríguez Patino, J. M. (2006). Formulation engineering of food model foams containing diglycerol esters and β-Lactoglobulin. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *45*(22), 7510-7519.

Baeza, R. (2003). Interacciones entre β-lactoglobulina y polisacáridos en coloides alimentarios. *Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. PhD* (p. 253). Buenos Aires, Argentina.

Baeza, R. I., Carrera Sánchez, C., Pilosof, A. M. R., & Rodríguez Patino, J. M. (2004). Interfacial and foaming properties of propylenglycol alginates. Effect of degree of esterification and molecular weight. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *36*, 139-145.

Baeza, R. I., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2005). Interactions between β-lactoglobulin and polysaccharides at the air-water interface and the influence on foam properties. En: E. Dickinson, *Food Colloids. Interactions, microstrucure and processing* (pp. 301-316). Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.

Carp, D. J. (2001). Formación y estabilidad de espumas de proteínas de soja: efecto de la desnaturalización térmica y de la interacción con polisacáridos. *Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. PhD*. Buenos Aires, Argentina.

Carp, D. J., Bartholomai, G. B., & Pilosof, A. M. R. (1999). Electrophoresis studies for determining soy proteins-xanthan gum interactions in foams. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *12*, 309-316.

Courthaudon, J. L., Dickinson, E., & Christie, W. W. (1991). Competitive adsorption of lecithin and κ-casein in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *39*, 1365-1368.

Damodaran, S., & Song, K. B. (1988). Kinetics of adsorption of proteins at interfaces: role of protein conformation in diffusional adsorption. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, *954*, 253-264.

Dickinson, E. (1992). *An introduction to food colloids*. Oxford, UK: Oxford University Press.

Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, *17*(1), 25-39.

Graham, D. E., & Philips, M. C. (1979). Proteins at liquid interfaces: II. Adsorption isotherms. *Journal of Colloid and Interface Science*, *70*, 415-426.

Graham, D. E., & Phillips, M. C. (1979). Proteins at liquid interfaces : III. Molecular structures of adsorbed films. *Journal of Colloid and Interface Science*, *70*(3), 427-439.

Huang, X., Kakuda, Y., & Cui, W. (2001). Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and the interfacial activity. *Food Hydrocolloids*, *15*, 533-542.

Kreuβ, M., Strixner, T., & Kulozik, U. (2009). The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropeptide. *Food Hydrocolloids*, *23*(7), 1818-1826.

Mackie, A. R., Gunning, A. P., Wilde, P. S., & Morris, V. J. (1999). The orogenic displacement of proteins from the air-water interface by surfactant. *Journal of Colloids and Interface Science*, *210*, 157-166.

Mackie, A. R., Gunning, A. P., Wilde, P. S., & Morris, V. J. (2000). Competitive displacement of β-lactoglobulin from the air-water interface by sodium dodecyl sulphate. *Langnuir*, *16*, 8176-8181.

MacRitchie, F., & Alexander, A. E. (1963). Kinetics of adsorption of proteins at interfaces. Part III. The role of electrical barriers in adsorption. *Journal of Colloid Science*, *18*(5), 464-469.

Martínez, K. (2007). Impacto de la hidrólisis enzimática de las proteínas de soja en sus propiedades interfaciales, de espumado y en la interacción con polisacáridos. *Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. PhD* (p. 243). Buenos Aires, Argentina: Universidad de Buenos Aires.

Nawar, W. W. (1985). Chapter 5. *Food Chemistry*. New York: Marcel Dekker.

Pavlovskaya, G. E., Semenova, M. G., Thzapkina, E. N., & Tolstoguzov, V. B. (1993). The influence of dextran on the interfacial pressure of adsorbing layers of 11S globulin vicia faba at the planar n-decane/aqueous solution interface. *Food Hydrocolloids*, *7*, 1-10.

Pérez, O. E., Carrera Sanchez, C., Rodríguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2006). Thermodynamic and Dynamic Characterization of Hydroxypropylmethylcellulose adsorved films at the air water interfase. *Biomacromolecules*, *7*, 388-393.

Pérez, O. E., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2007). Adsorption dynamics and surface activity at equilibrium of whey proteins and hydroxypropyl-methyl-cellulose mixtures at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, *21*, 794-803.

Rodríguez Patino, J. M., Rodríguez Niño, M. R., & Carrera Sánchez, C. (2003). Protein-emulsifier interactions at the air-water interface. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *8*(4-5), 387-395.

Sengupta, T., Razunovsky, L., & Damodaran, S. (2000). Phase separation in two- dimensional α_s-casein/β-casein/water ternary film at the air-water interface. *Langmuir*, *16*, 6583-6589.

Tornberg, E. (1978). The applacation of the drop volume technique to measurements of the adsorption of proteins at interfase. *Journal of Colloid and Interfase Science*, *64*, 391-402.

Ward, A. F. H., & Tordai, L. (1946). Time-Dependence of Boundary Tensions of Solutions I. The Role of Diffusion in Time-Effects. *The Journal of Chemical Physics*, *14*(7), 453-461.

Yilmazer, A. R., Carrillo, A. R., & Kokini, J. (1991). Effect of propylene glycol alginate and xanthan gum on stability of o/w emulsions. *Journal of Food Science*, *56*, 513-517.

Conclusiones generales

Los resultados de este trabajo indican que la asociación entre CMP y β–lg en solución acuosa es más una regla que una excepción y tiene un fuerte impacto sobre las propiedades funcionales (gelificación y comportamiento interfacial). Probablemente debido a que la β–lg domina el comportamiento de los sistemas mixtos CMP:β–lg en ambos tipos de coloides, no se ha dado importancia al estudio de la influencia de CMP en productos derivados del suero.
Finalmente, los resultados muestran que el sinergismo entre CMP y β–lg en ciertas condiciones puede ser explotado para el diseño de alimentos con una textura deseada conteniendo CMP como un ingrediente bioactivo.

Por otro lado, también se demuestra que la utilización de mezclas de proteínas y polisacáridos puede promover una mejora de las propiedades funcionales (por ejemplo las propiedades gelificantes o interfaciales).

De esta manera, el conocimiento y la caracterización de las interacciones entre proteínas y entre proteínas y polisacáridos permitirán la manipulación de propiedades macroscópicas de productos alimenticios, controlando las interacciones de un modo deseable, y logrando así la optimización en el uso de los ingredientes.