



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY

FACULTAD DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
PEDECIBA QUÍMICA



PEDECIBA

Tesis de Doctorado en Química

**“Obtención de proteínas
lácteas glicosiladas y
evaluación de las
modificaciones en las
propiedades funcionales de las
mismas”**

Ing. Alimentaria Alejandra Medrano

Febrero 2009

El presente trabajo para optar al grado de Doctor en Química (PEDECIBA Química) de la Universidad de la República, fue realizado en el Departamento de Ciencias y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Química, Montevideo, Uruguay y en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA), Universidad de la Plata, Buenos Aires, Argentina.

Bajo la dirección de los Doctores Maria Cristina Añón, Patrick Moyna y Luis Panizzolo

1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Leche

La leche es un fluido biológico que se forma en la glándula mamaria de las hembras de los mamíferos constituyendo la única fuente de nutrición de los recién nacidos. Su [función](#) en la [naturaleza](#) es nutrir y facilitar protección inmunológica a los [mamíferos](#) jóvenes, pero también ha sido una fuente de [alimentación](#) esencial para [el hombre](#) desde tiempos remotos, quien ha desarrollado la especialización productiva de varias especies (Hoffmeister, 1989). La leche está constituida principalmente por [agua](#) 87,3% (rango de 85,5 % - 88,7%), grasa 3,9 % (rango de 2,4% - 5,5%), sólidos no grasos 8.8 % (rango de 7,9 % - 10,0 %) entre ellos proteína 3,25% (rango de 2,3 % - 4,4 %), lactosa 4,6% (rango de 3,8-5,3), minerales (Ca, P, citrato, Mg, K, Na, Zn, Cl, Fe, Cu, sulfato, bicarbonato) 0.65% (rango de 0,53 % - 0,80 %), ácidos (citrato, acetato, lactato, oxalato) 0.18% (rango de 0,13 % - 0,22 %). Enzimas: peroxidasa, catalasa, fosfatasa, lipasa y otras proteínas, Gases: [oxígeno](#), nitrógeno, dióxido de [carbono](#), Vitaminas: A, C, D, tiamina, riboflavina, otras (Walstra y Jenness, 1987).

La [estructura física](#) de dichos componentes, hace que la leche sea uno de los líquidos más complejos que se conocen pues combina propiedades de emulsión, suspensión y solución acuosa. En el primer caso debido a la dispersión de los glóbulos de grasa, en segundo lugar por la suspensión coloidal de las micelas de caseína, proteínas globulares (α -Lactoalbumina y β -Lactoglobulina) y partículas lipoproteicas y por último, debido a la disolución en agua de la lactosa, proteínas solubles, minerales, [vitaminas](#) y otros componentes. De aquí se deriva la importancia de las interacciones entre los diferentes componentes de la leche (Walstra y Jenness, 1987).

La glándula mamaria durante la lactación es uno de los [tejidos](#) más [activos](#) y diferenciados de los mamíferos, donde ocurren profundos cambios y [procesos](#) metabólicos involucrados en la síntesis y secreción de los componentes, pero que dependen en primera instancia de la digestión y absorción de los alimentos y del metabolismo en general, de donde provienen la mayor parte de los metabolitos necesarios para la síntesis de la leche (Fox y Flynn, 1992; Amiot, 1994; Hurley, 2000).

1.2.- Proteínas lácteas

Aunque la composición de la leche varía cuantitativamente y cualitativamente entre las diferentes especies, las proteínas de la leche de los mamíferos pueden dividirse en dos grandes grupos, las caseínas y las proteínas del suero.

Estos dos grandes grupos de proteínas, se separan en base a su solubilidad a pH 4,6 a 20° C. Bajo esas condiciones, un grupo de proteínas precipitan y son las denominadas caseínas. Este grupo de proteínas constituye aproximadamente el 80 % de las proteínas de la leche. El segundo grupo está formado por proteínas que permanecen solubles en las condiciones mencionadas y corresponde a las proteínas del lactosuero o de suero de leche (Fox y Kelly, 2004).

1.2.1.- Caseínas

En la fracción caseína bovina podemos encontrar cuatro proteínas principales: α_{s1} , α_{s2} , β y κ -caseínas (α_{s1} -CN α_{s2} -CN, β -CN y κ -CN), en una proporción de 38, 10, 36 y 13 %, respectivamente (Tornberg y col., 1997; Fox y Kelly, 2004). Las caseínas bovinas presentan polimorfismo genético: se han caracterizado 7, 4, 9 y 8 variantes para la α_{s1} -CN α_{s2} -CN, β -CN y κ -CN respectivamente. Sus principales propiedades se muestran en Tabla 1.1.

Tabla 1.1 Propiedades principales de las caseínas (Walstra y Jenness, 1987).

Proteína	Peso molecular (kDa)	Residuos prolina por molécula	Residuos cisteína por molécula	Residuos fosfato por molécula	Glicoproteína
α_{s1} -caseínas	23,2	17	0	8	No
α_{s2} -caseínas	25,4	10	2	11	No
β -caseínas	24	35	0	5	No
κ -caseínas	19	20	2	1	Si

Todas las caseínas son proteínas fosforiladas. Los grupos fosfato están esterificados como monoésteres a residuos de serina (Ser-P) y en menor medida, de treonina (Thr-P), lo cual les da una gran capacidad de unión a cationes divalentes, especialmente el Ca^{2+} , que es el principal catión divalente en la leche (Yey y Singh, 2001). Esta propiedad es de suma importancia desde el punto de vista nutricional. Los grupos fosfatos son adicionados a partir de ATP en una reacción catalizada por casein-quinasas. Los residuos de Ser-P no están ubicados al azar en la estructura primaria de las caseínas sino que forman parte de “clusters” o grupos. Debido a que la κ -CN tiene un solo residuo de (Ser-P-149), exhibe la menor capacidad de unir cationes divalentes de todas las moléculas de caseína.

Por otro lado, la κ -CN es la única caseína glicosilada; contiene restos de glucosa, galactosamina y ácido *N*-acetilneuramínico (como tri o tetrasacáridos) ligados a restos de treonina por enlaces *O*-glicosídicos en la región C terminal.

La α_{S2} -CN y la κ -CN tienen grupos de cisteína, que normalmente están formando parte de puentes disulfuro intermoleculares. La α_{S2} -CN existe normalmente como dímero, mientras que la κ -CN puede formar agregados de hasta 10 moléculas (Fox y Kelly, 2004). Las α_{S1} -CN y β -CN no poseen restos de cisteína en su estructura primaria (Tabla 1.1).

En todas las moléculas de caseína los residuos de prolina están distribuidos uniformemente a lo largo de la cadena, previniendo la formación de α -hélices, β -hoja plegada y giros β . Por tal motivo estas proteínas no tienen elementos de estructura secundaria ni una estructura terciaria definida, lo cual les da un alto grado de flexibilidad estructural y de hidrofobicidad superficial. Los restos de aminoácidos no polares, polares y cargados no se encuentran distribuidos uniformemente en la secuencia sino están agrupados dentro de la misma (“clusters”). En consecuencia, las estructuras tienen un marcado carácter anfifílico, con regiones hidrofílicas e hidrofóbicas perfectamente definidas lo que les da una gran capacidad de asociarse en solución y de tener una elevada actividad interfacial.

Debido a esta capacidad de asociación, las caseínas forman agregados supramoleculares de naturaleza coloidal llamados micelas. Por estudios de microscopía electrónica se sabe que las micelas de caseína tienen forma esférica y su diámetro puede variar entre 50 y 500 nm (promedio, 120 nm), con un peso molecular en el rango de 103 - 3.106 kDa. Estas partículas

coloidales son altamente hidratadas (2,0 g de H₂O por cada g de proteína). El material seco contiene 94 % de proteínas y 6 % de sustancias no proteicas, especialmente calcio y fósforo, formando fosfato de calcio coloidal. Las propiedades de unión de las caseínas al Ca²⁺ y su organización micelar permiten que este fosfato de calcio coloidal se mantenga “soluble” en la leche. Más allá de que se propusieron distintos modelos de estructura micelar, se sabe que la κ-CN es la proteína estabilizante de dicha estructura, debido a su poca sensibilidad al Ca²⁺ y el extremo C-terminal hidrofílico, que contiene doce residuos aminoácidos cargados negativamente, y la unión del resto oligosacárido. Según el modelo propuesto por Walstra (1999), la micela de caseína está constituida por partículas coloidales de menor tamaño denominadas submicelas (aproximadamente 10-15 nm), que se forman en la glándula mamaria y se ensamblan por efecto del fosfato de calcio coloidal. La κ-CN, que se ubica heterogéneamente en la superficie de las submicelas más externas, impide la agregación de las micelas en la leche (medio rico en Ca²⁺), por repulsión electrostática y estérica.

La caseína comercial se prepara por acidificación de la leche descremada a pH 4,5 y calentamiento a 45° C (Kinsella, 1984). Los cambios en la estructura de la micela por efecto de la reducción del pH están mediados en parte por los cambios en el contenido de fosfato coloidal de las micelas. El efecto es su gradual desintegración, como consecuencia de la reducción de la carga neta negativa de las caseínas, la reducción en el grado de hidratación (en el rango de pH 4,6-5,4) y el incremento de la fuerza iónica del suero por la disolución del fosfato de calcio coloidal, lo cual favorece la agregación de las caseínas. En el punto isoeléctrico, se forma una red proteica de moléculas de caseína que se disociaron durante el proceso de acidificación, las cuales conservan de manera residual la estructura micelar. Esto ha sido confirmado por estudios de microscopía electrónica (Fox y Kelly, 2004).

1.2.2.- Proteínas del lactosuero

Las proteínas del lactosuero, que representan alrededor del 20% de las proteínas de la leche de vaca, se definen como aquellas que se mantienen en solución tras precipitar las caseínas a pH 4,6, a una temperatura de 20°C. Esta separación entre caseína y proteínas del lactosuero fue llevada a cabo por primera vez por Hammarsten en 1883, y todavía se utiliza el término "caseína

de Hammarsten" para designar a la precipitada de esta forma. Este científico consideró que las proteínas del lactosuero eran "globulinas", es decir, el tipo de proteína soluble en soluciones salinas pero insoluble en agua destilada. Trabajos posteriores, especialmente de Sebelien, en 1885, demostraron que estas proteínas eran más bien del tipo de las albúminas, solubles en agua destilada. La polémica lactoalbúmina - lactoglobulina ha dejado los nombres para las dos principales proteínas del lactosuero, aunque ambas pertenecen a la fracción "albúminas".

La composición proteica del lactosuero presenta diferencias notables dependiendo de la especie considerada. Las proteínas del lactosuero pueden ser de síntesis mamaria, como la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina, que representan conjuntamente el 70% de las proteínas del lactosuero de vaca, y la lactoferrina, o bien de transferencia sanguínea, como la albúmina sérica bovina (BSA) y las inmunoglobulinas (Ig-G, Ig-A, Ig-M). Como también proteasa-peptonas que se producen por la hidrólisis de la caseína β , por la acción de proteasas naturales de la leche.

Las propiedades funcionales del lactosuero vienen dadas por las propiedades de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina. Entre ellas se destacan su solubilidad, incluso a pH 4,5, sus propiedades emulsionantes y espumantes, y su capacidad de gelificación.

Estas proteínas se recuperan por ultrafiltración o intercambio iónico, con secado a temperaturas lo más bajas posible para evitar su desnaturalización.

1.2.2.1.- α -Lactoalbúmina

La α -lactoalbúmina es una proteína sérica globular de bajo peso molecular (14,2 KDa) que pertenece a la familia de las metaloproteínas (Hiroaka y col., 1980). Esta formada por una sola cadena polipeptídica de 123 aminoácidos. Su estructura terciaria, muy compacta, globular, está mantenida por cuatro puentes disulfuro, con una zona de hélice α y otra de hojas plegadas β . Es una proteína ácida con un punto isoeléctrico de alrededor de 4,8. En la vaca existen dos variantes genéticas, con distribución desigual según las razas. En las razas europeas solamente existe la variante B, con arginina en la posición 10. En las razas indias existe también la variante A, con glutamina en esa misma posición.

Desde el punto de vista nutricional, la α -lactalbúmina es importante dada la abundancia de triptófano, 4 residuos por molécula, lo que representa un 6% en peso. Es una de las proteínas de la leche que pueden causar alergia en el consumidor. La zona más alergénica de la molécula es la situada entre la valina en posición 42 y el ácido glutámico de la posición 49

La principal función de la α -lactoalbúmina es la de intervenir en la biosíntesis de la lactosa al formar parte, junto con la enzima galactosiltransferasa, de la enzima lactosa sintetasa. La α -lactoalbúmina se sintetiza como respuesta a los procesos hormonales que inducen la lactación. Una vez sintetizada, es transportada al aparato de Golgi, donde se une a la galactosil transferasa. Su acción se produce al aumentar la afinidad de la galactosiltransferasa por la glucosa. La α -lactalbúmina se secreta en la leche, junto con la lactosa, en las vesículas secretoras producidas a partir de las membranas del aparato de Golgi (Brew y Grobler, 1992). La lactosa es un componente importante de la leche de numerosas especies al mantener su equilibrio osmótico, generando una parte importante de su fase acuosa, por lo que, la síntesis de la α -lactoalbumina es necesaria para una correcta secreción láctea (Stacey y col., 1995).

La α -lactalbúmina tiene un ión calcio unido, que es imprescindible en el mantenimiento de su estructura y de su actividad como reguladora de la enzima galactosiltransferasa. La eliminación del calcio produce una estructura "molten globule", un estado intermedio de desnaturalización que ha sido muy utilizado como modelo en la desnaturalización de proteínas. Este estado, con la proteína en forma "apo", es mucho menos resistente que la forma saturada con calcio a agentes desnaturalizantes, como el calentamiento.

La α -lactalbúmina es la segunda proteína en concentración en el lactosuero de vaca (entre 1 y 1,5 mg /mL), y la más abundante en el lactosuero humano (Fox y Kelly, 2004).

1.2.2.2.- Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas son proteínas que forman parte del sistema de defensa contra microorganismos. La estructura básica, con forma de Y, está constituida por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un puente disulfuro, mientras que

las dos cadenas pesadas se unen entre sí mediante dos puentes disulfuro. Las cadenas pesadas están glicosiladas.

La actividad de defensa de las inmunoglobulinas del calostro y la leche se puede ejercer de dos formas:

- En las especies en las que la placenta no permite el paso de inmunoglobulinas, como en los rumiantes, las inmunoglobulinas del calostro (del tipo Inmunoglobulinas G) transmiten la inmunidad pasiva desde la madre.
- En todos los casos, las inmunoglobulinas, especialmente las Inmunoglobulinas A, actúan como sistema de defensa en el tubo digestivo del lactante

En la leche de vaca, aproximadamente el 80% de la inmunoglobulinas presentes en la leche son de tipo Inmunoglobulinas G. La concentración de estas proteínas en la leche es de 0,4 a 1 mg/mL, aunque es muchísimo más elevada en el calostro (Fox y Kelly, 2004).

1.2.2.3.- Albúmina Sérica Bovina

La albúmina de la leche es la misma que se encuentra en la sangre, y procede de ella. Es una proteína relativamente grande, con una cadena formada por 528 aminoácidos. En el lactosuero se encuentra en una concentración de alrededor de 0,4 mg/mL (Fox y Kelly, 2004).

1.2.2.4.- Lactoferrina

La lactoferrina es una proteína fijadora de hierro, emparentada estructuralmente con la transferrina de la sangre y con la ovotransferrina del huevo. Tiene carácter básico, con un punto isoeléctrico próximo a 9. Es una glicoproteína que está formada por dos lóbulos, unidos por una hélice de tres vueltas. Los dos lóbulos tienen un 37% de homología de secuencia, por lo que es probable que procedan de una proteína antecesora de la mitad de tamaño. Como estructura secundaria, domina la estructura α -hélice.

La afinidad de la lactoferrina por el hierro es muy grande, siendo la constante de afinidad por el ión férrico del orden de 10^{20} M^{-1} . Los puntos de unión del hierro están localizados en posiciones equivalentes en ambos lóbulos. La unión del hierro es reversible, y tiene lugar en presencia de un ión carbonato o bicarbonato por cada ion férrico. El hierro se une directamente a

los grupos laterales de dos tirosinas, una histidina y un ácido aspártico, mientras que el ión carbonato (o bicarbonato) también unido al hierro interacciona con la cadena lateral de una arginina.

La lactoferrina es abundante en la leche humana, encontrándose también en concentraciones significativas en la leche de los rumiantes y en la de yegua. En todos los casos, la concentración es mayor en el calostro, pero en la leche humana se mantiene también una concentración significativamente elevada a lo largo de toda la lactación.

La lactoferrina de la leche está muy poco saturada con hierro, ya que una de sus misiones es la protección del recién nacido mediante el secuestro del hierro, haciendo éste no disponible para las bacterias y para la formación de radicales libres en las reacciones de oxidación (Fox y Kelly, 2004.)

1.2.2.5.- β -Lactoglobulina

La β -lactoglobulina es la proteína más abundante en el lactosuero bovino, en el que alcanza concentraciones de 2 a 4 mg/mL, representando alrededor de la mitad de las proteínas del lactosuero. Está presente también en la leche de otras especies, como la equina y porcina, pero no se encuentra en la leche humana. Está formada por una sola cadena de 162 aminoácidos, con un peso molecular de unos 18.350 Da. Existen varias variantes genéticas, siendo las más comunes las llamadas A y B, que difieren en dos aminoácidos. La variante A tiene una valina en la posición 118, y un ácido aspártico en la posición 64, mientras que la variante B tiene alanina y glicina en dichas posiciones (Tabla 1.1). La función de la β -Lactoglobulina no se ha establecido todavía con seguridad, aunque probablemente, al menos en el caso de los rumiantes, se trata de una proteína transportadora de ácidos grasos, que ejerce su función en el tubo digestivo del lactante (Green y col., 1979; Dong y col., 1996; Manderson y col., 1999).

Al pH de la leche, la β -lactoglobulina de los rumiantes se presenta en forma de dímero, con los monómeros unidos de forma no covalente, en cambio en el resto de las especies se encuentra en forma de monómero (Hambling y col., 1992). Estos dímeros se forman entre pH 7,5 y pH 5,2, el punto isoeléctrico de la β -lactoglobulina. Por encima de pH 7,5 y por debajo de pH 3,5, la β -lactoglobulina está en forma de monómeros, mientras que entre pH 5,2 y pH 3,5 se encuentra en forma de octámero. Es estable a pH ácidos pero

se desnaturaliza con relativa facilidad por el calor, especialmente en ausencia de ligandos asociados. La β -lactoglobulina es la más hidrofóbica de las proteínas del lactosuero y es capaz de interactuar con distintas moléculas hidrofóbicas, especialmente el retinol y los ácidos grasos.

Tabla 1.2 Estructura primaria de β -Lactoglobulina 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	51
Val Tyr Val Glu Glu Leu Lys Pro Thr Pro Glu Gly Asp Leu Glu Ile Leu Leu Gln Lys	
61	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
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	

1.2.2.5.1- Estructura monomérica de β -Lactoglobulina

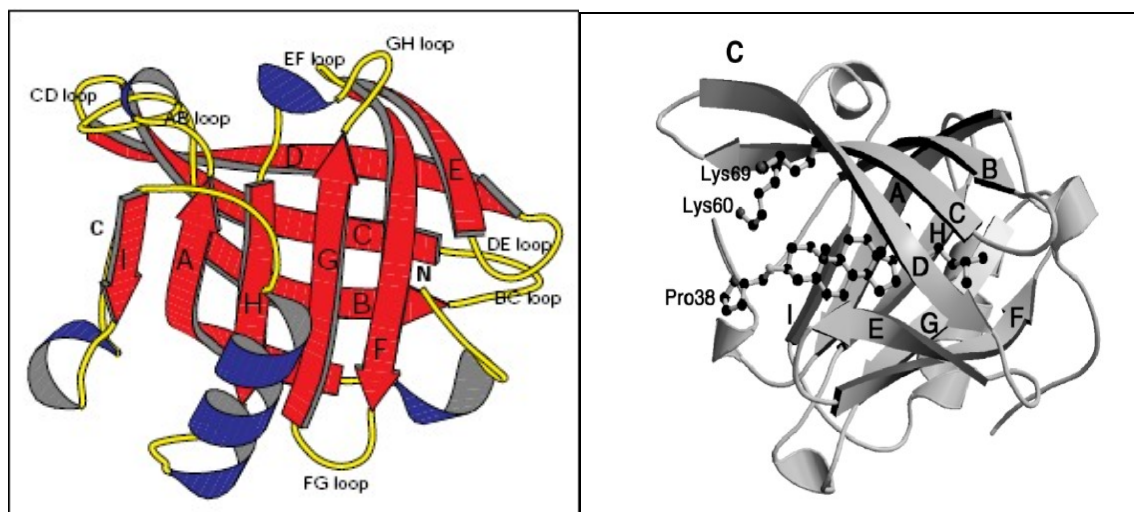


Figura 1.1. Diagrama del monómero de β -Lactoglobulina utilizando MOLSCRIPT (Kraulis, 1991).

En 1986 Papiz y col. determinaron mediante técnicas cristalográficas la estructura terciaria de la β -Lactoglobulina bovina (Figura 1.1), la cual mostraba una gran similitud con otra proteína conocida como RBP (proteína transportadora de retinol en sangre), por lo que se la incluyó dentro de la familia de las lipocalinas.

Las lipocalinas, junto a las avidinas y las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABPs), pertenecen a una superfamilia de proteínas conocidas como las calicinas. Estas proteínas se caracterizan por poseer una estructura tridimensional conservada que les confiere propiedades de unión a moléculas hidrofóbicas (Flower, 1996). Actualmente, existen otras proteínas que forman parte de esta superfamilia, como la triabina o el grupo de inhibidores de las metaloproteinasas (MPIs) pero que difieren en su función al no transportar moléculas de carácter hidrofóbico (Flower y col., 2000).

La familia de las lipocalinas comprende un grupo de pequeñas proteínas extracelulares, con estructuras y funciones diferentes, originadas a partir de una proteína ancestral común que se ha diversificado (Gutierrez y col., 2000). Entre los miembros de esta familia podemos encontrar como se indicó previamente a la RBP (Retinol Binding Protein) y también a MUP (Major Urinary Protein), OBP (Odorant-Binding Protein), OP (Olfactory-specific Protein) y la PP14 (Human Placental Protein). Muchas de las lipocalinas actuales muestran una gran divergencia en su secuencia aminoacídica y presentan un elevado nivel de duplicación génica (Gutierrez y col., 2000). A pesar de la baja similitud aminoacídica, la familia de las lipocalinas se caracteriza por poseer pequeños motivos bien conservados en su secuencia.

La β -Lactoglobulina se agrupa dentro de la familia de las “Kernel” lipocalinas, las cuales se caracterizan por poseer tres motivos en su secuencia correspondientes a las tres principales regiones de estructura conservada de estas proteínas (Flower, 1996). La estructura común de las lipocalinas consiste en un barril aplanado formado por ocho β -hojas plegadas antiparalelas (A-H), seguidas por una α -hélice de tres vueltas y por otra β -hoja plegada (I) próxima al extremo C terminal (Figura 1.1).

La estructura terciaria de los monómeros de la β -lactoglobulina está mantenida por dos puentes disulfuro. También existe un grupo tiol libre, el correspondiente a la cisteína que ocupa el lugar 121 en la secuencia. Este tiol es muy importante en la asociación con otras moléculas, especialmente con la κ -caseína. Esta asociación tiene una gran influencia en la coagulación de la

leche inducida por la quimosina. Los puentes disulfuro son también bastante reactivos, y dan lugar a reacciones de intercambio de sulfidrilos.

En base a los resultados obtenidos por dicroísmo circular (CD), se ha calculado que la estructura secundaria de β -Lactoglobulina posee entre 10 a 15% α -hélice, 50% β -hoja plegada, y 15 a 20% giros β . La estructura tridimensional exhibe la formación de nueve β -hojas plegadas con las que conforman una estructura similar a una canasta (barril β), numeradas desde A a I. En la β -hoja plegada D se encuentra la Cis 66 que forma puente disulfuro con la Cis 160 la cual se encuentra en el exterior de la molécula, en la β -hoja plegada E. La β -hoja plegada-G que contiene a la Cis 106 que forma con la Cis 119 de la β -hoja plegada-H un puente disulfuro. Fuera de las hojas plegadas del β -barril, existen 3 α -hélices amino-terminales (AB), una α -hélice carboxiterminal (GH) y una tercer α -hélice final que une la β -hoja plegada-H con la β -hoja plegada-I. Después de la β -hoja plegada-I existe un extremo flexible hasta el extremo C terminal en el que se incluye la Cis 160. La β -hoja plegada-I es una hoja antiparalela que junto con el bucle AB participa de la interfase que forma el dímero. Esta estructura tridimensional genera un bolsillo interior de unión a un ligando lipófilico. Las nueve cadenas proteicas con estructura de β -hoja plegada están unidas entre sí por bucles proteicos, los cuales varían en dimensión y en configuración espacial. Estos bucles están encargados de la interacción con macromoléculas. Entre los aminoácidos que están disponibles para reaccionar se encuentran las Tyr 42 y 102 ubicadas en el extremo de la β -hoja plegada-B, el Trp 19 y la Tyr 20 en la base del bolsillo hidrofóbico, la Tyr 99 en bucle FG y el Trp 61 al final de β -hoja plegada-C. Este último está relativamente expuesto dada la cercanía del puente disulfuro Cis 66-Cis 160 en el bucle CD. Así como afectan la reactividad con el medio, los Trp afectan la fluorescencia intrínseca de la β -Lactoglobulina. Algunos autores sugieren que la Cis 121 y la Cis 119 son igualmente susceptibles de participar en la formación del puente disulfuro con Cis 106. Igualmente la Cis 121 se encuentra muy protegida dentro de la β -hoja plegada-H y por una de las 3 hélices.

Tanto la región C-terminal (residuos 158-160) como los bucles CD (residuos 60-64) están expuestos y móviles. Todos los residuos Asp y Glu están en la superficie excepto el Glu 89 que se une por puente hidrógeno con la Ser 116 y el Asp 33 que está dentro de la interfase entre los dos monómeros para formar el dímero.

La β -Lactoglobulina posee 15 grupos Lys. Entre estas, las Lys 47 y Lys 135, no son reactivas dado que se encuentran protegidas por la interacción entre Tyr 102 y Glu 55. Las Lys 60 y Lys 91 poseen una baja superficie de accesibilidad, en cambio hay cuatro lisinas muy reactivas 8, 77, 100, y 141, con una superficie altamente expuesta (Flower y col., 2000; Fogliano y col., 1998).

1.2.2.5.2- Estructura dimérica de β -Lactoglobulina

La interfase del dímero esta formada por la β -hoja plegada-I de monómeros adyacentes (Arg 148, Ser 150, His 146) y el bucle AB de monómeros adyacentes (Ala 34, Asp 33, Arg 40) los que interaccionan por doce puentes de hidrógeno (Figura 1.2). Cuatro puentes de hidrógeno se establecen entre las β -hoja plegada-I adyacentes interviniendo los residuos Arg148, Ser150, His146 (Figura 1.2d). El resto de los puentes de hidrógeno se establecen entre los bucles AB interviniendo los residuos Ala34, Asp33, Arg40 (Figura 1.2 c). La interacción entre el nitrógeno de la Ala 34 y el oxígeno del Asp 33 introducen una cierta tensión a la estructura.

Al pH fisiológico la β -Lactoglobulina de todas las especies rumiantes se encuentra, como se indicó previamente, formando un dímero y en todos se mantienen los mismos puentes de hidrógeno de la interfase del bucle AB, pero hay cierta variabilidad dentro de los residuos que participan en las β -hojas plegadas-I.

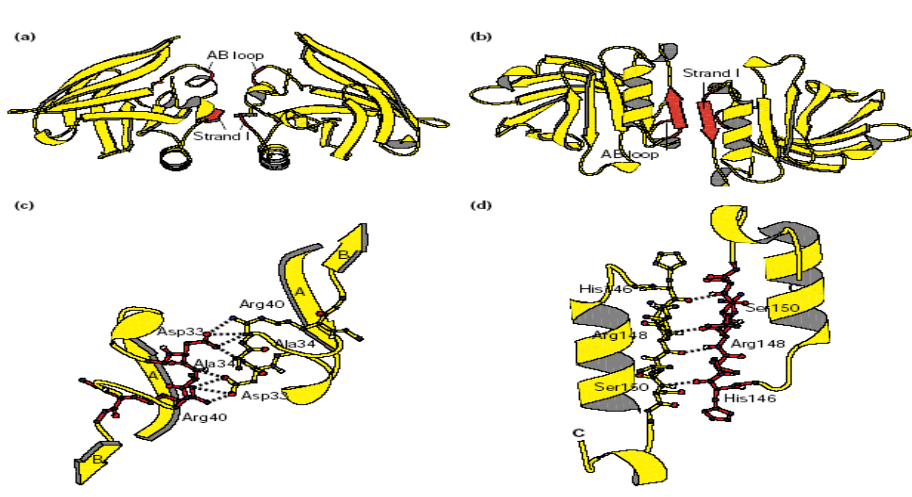


Figura 1.2.- La interfase de la β -lactoglobulina por rayos X. La interfase esta coloreada de rojo y los puentes de hidrogeno están representados por líneas punteadas **(a)** La interfase vista a lo largo de la hoja β -I y **(b)** rotación del plano en a 90° **(c)** puente de hidrógeno entre bucles AB adyacentes **(d)** puente de hidrógeno entre hojas β adyacentes

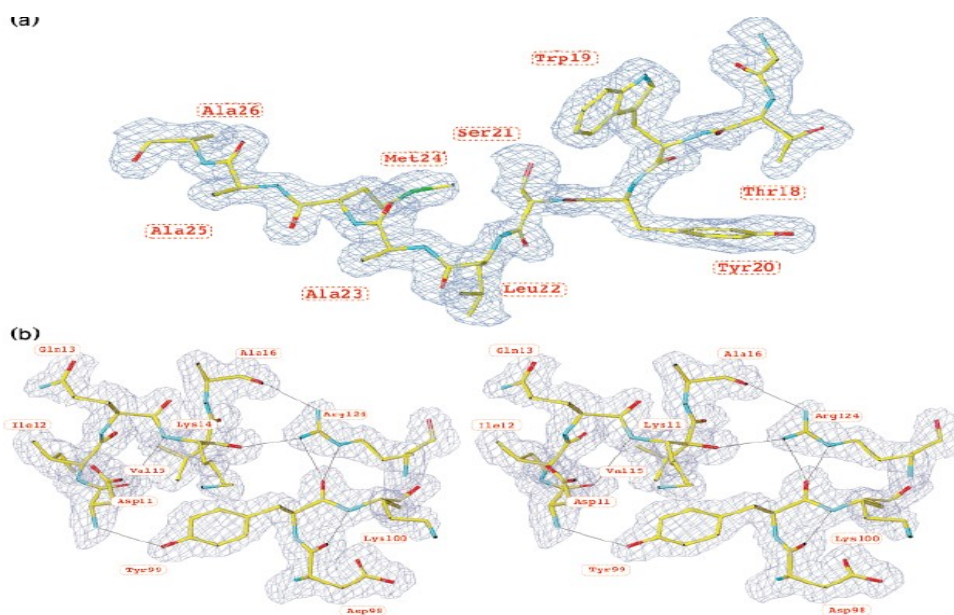


Figura 1.3.- Densidad electrónica de determinadas regiones de β -Lactoglobulina (a) Residuos 18-26 de β -Hoja plegada-A (b) Diagrama de la densidad electrónica del giro que abarca entre Tyr 99 y Arg 124.

1.2.2.5.3- Función de β -Lactoglobulina

Aunque no se le ha atribuido ninguna función biológica definitiva, la composición aminoacídica y la cantidad de β -Lactoglobulina presente en la leche de los rumiantes respaldan un posible papel nutricional de esta proteína. Sin embargo, su similitud en secuencia y estructura terciaria con otros miembros de las lipocalinas, sugiere una función de esta proteína en el transporte de moléculas hidrofóbicas.

En 1986, Papiz y col. propusieron que la función de la β -Lactoglobulina era el transporte de vitamina A (retinol) desde la glándula mamaria materna hasta el intestino del lactante. Esta hipótesis se veía reforzada por la gran similitud de la β -Lactoglobulina con la RBP, la existencia de receptores específicos para el complejo β -Lactoglobulina-retinol en el intestino de terneros recién nacidos y la elevada estabilidad de la β -Lactoglobulina en medio ácido resistiendo a la proteólisis gástrica. No obstante, estudios realizados in vitro muestran una asociación del retinol con otras proteínas lácteas como la seroalbumina o la α -lactoalbumina (Puyol y col., 1991), indicando una posible interacción inespecífica de esta molécula. El retinol está asociado a los glóbulos grasos de la leche, siendo muy probable la transferencia madre-cria a través de esta ruta. Por otra parte, la β -Lactoglobulina ha sido aislada de la leche de los rumiantes unida a diferentes

ácidos grasos y triglicéridos, pudiendo tener un papel importante en el transporte de lípidos de la leche. La composición de ácidos grasos que une la β -Lactoglobulina es muy similar a la que se encuentra en la fracción sérica de la leche indicando que no hay una selección de determinados ácidos grasos en la unión con la β -Lactoglobulina (Perez y col., 1989). Estudios in vitro muestran como el ácido palmítico se une en la cavidad central de la β -Lactoglobulina, de forma similar a la unión del retinol con la RBP (Wu y col., 1999).

Gracias a esta capacidad de unión a ácidos grasos se ha descrito un posible papel modulador de la β -Lactoglobulina al facilitar la actividad de la lipasa pregástrica en terneros recién nacidos (Perez y col., 1992). El papel de la β -Lactoglobulina sería secuestrar los ácidos grasos libres que inhiben la actividad de las lipasas, permitiendo así la digestión de los lípidos de la leche en el estómago. Esta lipasa es muy estable a pH bajo y a la degradación de la pepsina y es muy importante en los animales recién nacidos al tener bajas concentraciones de sales biliares y de lipasa pancreática.

Un estudio realizado con terneros pre-rumiantes (Kushibiki y col., 2001) determina la participación de la β -Lactoglobulina en el metabolismo lipídico, incrementando la actividad de la lipasa pregástrica y la absorción intestinal de ácidos grasos de cadena larga y triglicéridos. Asimismo este estudio sugiere la participación de la β -Lactoglobulina en el transporte de retinol incrementando su absorción intestinal. Este trabajo reforzaría los estudios in vitro realizados anteriormente por otros autores. A pesar de esto, la β -Lactoglobulina de las especies monogástricas carece de las propiedades de unión a los ácidos grasos sugiriendo que, en estas especies, la β -Lactoglobulina desempeña una función diferente (Perez y col., 1992). Esta hipótesis se vería reforzada por la falta de esta proteína en la leche de algunos mamíferos y la existencia de distintos tipos activos de β -Lactoglobulina en una misma especie.

1.2.2.5.4- Efecto del tratamiento térmico

A medida que la temperatura se incrementa la β -Lactoglobulina sufre modificaciones estructurales, lo que afecta la funcionalidad (Browdy y Harris, 1997).

La estructura nativa de β -Lactoglobulina contiene un interior hidrofóbico, interior del β -barril y un exterior hidrofóbico, ubicado entre el β -

barril y la α -hélice (Lopez y Olano, 1999). Por lo general, el núcleo hidrofóbico de β -Lactoglobulina está protegido del disolvente por la estructura terciaria rígida, lo que supone una baja afinidad por sondas vinculantes a regiones hidrofóbicas como ANS. Pero al perturbar la estructura terciaria por un tratamiento térmico, la afinidad de la β -Lactoglobulina a ANS aumenta, provocando también un corrimiento del máximo de emisión de fluorescencia hacia el rojo. Existen dos grupos triptófanos que tienen un papel importante en la variación de la hidrofobicidad, el Trp19 y Trp61 (Marcia y col., 2004; Iametti y col., 1996). Además de la variación en la hidrofobicidad superficial por tratamiento térmico, la reactividad del grupo sulfidrilo libre (Cis-121) también se ve modificada. En el estado nativo el sulfidrilo libre se encuentra en el centro hidrofóbico, pero al desplegarse la molécula queda expuesto provocando una agregación entre moléculas (Aparenten, 1998; Funtenberger y col., 1997; Jameson y col., 2002)

Según varios autores Aymard y col. (1996), Roefs y de Kruif (1994), Surroca y col. (2002), Verheul y col. (1998) la desnaturalización térmica, a pH neutro, es un proceso en dos etapas. En primer lugar se desnaturaliza la proteína, por la ruptura de puentes de hidrógeno, y esto es seguido por agregación de proteínas, iniciada por la formación de enlaces hidrofóbicos y puentes disulfuro.

Según Qi y col. (1997) recién a partir de 65°C la β -Lactoglobulina forma monómeros de estructura abierta “molten globule” en la cual se pueden dar reacciones de agregación.

1.2.2.5.5- Efecto de la variación del pH

La β -lactoglobulina de los rumiantes puede adoptar diferentes formas estructurales dependiendo del pH en que se encuentre, como se mencionó anteriormente, al pH de la leche se encuentra como dímero, estructura que se mantiene entre pH 7,5 y pH 5,2.

Hay una serie de cambios conformacionales que le ocurren a la β -Lactoglobulina inducidos por cambios del pH los que son fácilmente observados por dispersión óptica. Uno de ellos, denominado transición Tanford, se produce cerca de pH fisiológico entre pH 6,5 y pH 8,0. Se caracteriza por la titulación de un grupo carboxilo (Glu 89) anómalo con un pKa 7,3 y un cambio en el medio ambiente de un residuo Tyr acompañado por

un aumento de la reactividad del grupo sulfhidrilo libre (Sakurai y Goto, 2006). Según estos autores al comparar dos estructuras cristalográficas a pH 6,2 y 7,1 encontraron que la transición de Tanford provoca un cambio conformacional en el bucle EF, situado en el extremo abierto de la cavidad hidrofóbica, cuando el pH es de 6,2 el bucle EF se orienta tapando la entrada a la cavidad mientras que abre la entrada a pH de 7,1 (Figura 1.4).

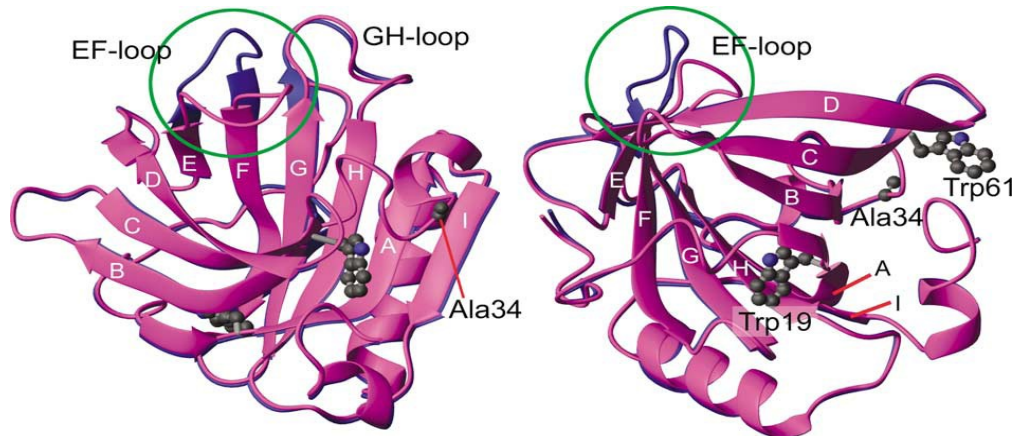


Figura 1.4 Superposición de estructuras cristalográficas a pH 6,2 (magenta) y pH 7,1 (azul). Las dos estructuras son superponibles a excepción del bucle EF (indicado por un círculo verde) y los residuos Ala34, Trp19 y Trp61 (Koradi y col., 1996).

1.3 Glicosilación no enzimática de proteínas

La reacción de Maillard es una de las reacciones más importantes que tienen lugar en el proceso térmico de los alimentos. Fue descubierta por el químico francés Luis Camille Maillard (1912) estudiando el calentamiento de una solución de glucosa con lisina, y consiste en un conjunto de reacciones relacionadas que todavía no han sido elucidadas en su totalidad. Hodge (1953) recopiló toda la información disponible en un esquema simplificado Figura 1.5 que sigue siendo considerado en la actualidad como la descripción más apropiada del proceso de pardeamiento no enzimático.

La reacción de Maillard modifica las propiedades organolépticas de los alimentos al formarse una gran variedad de compuestos que son los responsables de los sabores, aromas y color característicos. También da lugar a una pérdida del valor nutritivo, debido a la disminución de la biodisponibilidad de los aminoácidos implicados en el proceso.

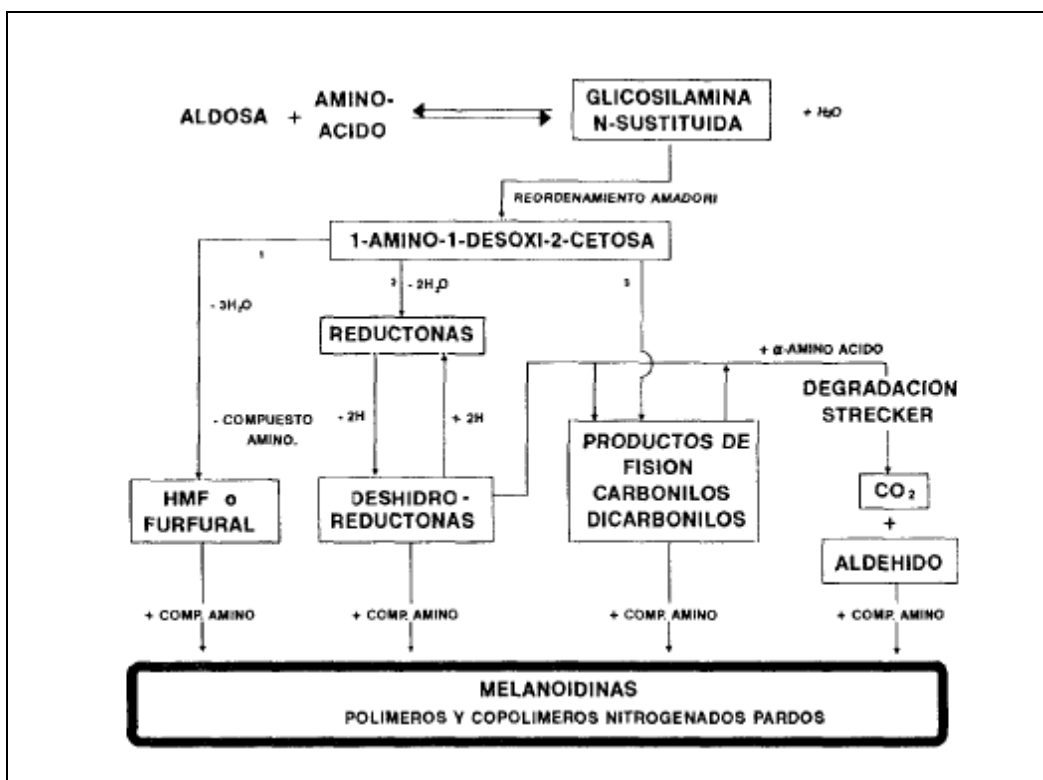


Figura 1.5 Esquema de la reacción de Maillard según Hodge 1953

Como se puede apreciar en la Figura 1.5, la reacción de Maillard transcurre en distintas etapas hasta la formación final de pigmentos pardos de alto peso molecular llamados melanoidinas.

Podemos hacer una clasificación de las distintas reacciones en tres etapas fundamentales.

1.3.1 Etapas iniciales

Las primeras etapas de la reacción de Maillard conducen a la formación de una serie de compuestos conocidos como compuestos de Amadori. En el caso de la β -Lactoglobulina, relativamente rica en lisina con un grupo ϵ -amino libre muy reactivo, es este aminoácido el que reacciona con la lactosa para formar lactulosil-lisina (ϵ -N-(1-desoxi-D-lactulosil)-L-lisina) como compuesto mayoritario. El esquema de formación de estos compuestos se detalla en la Figura 1.6.

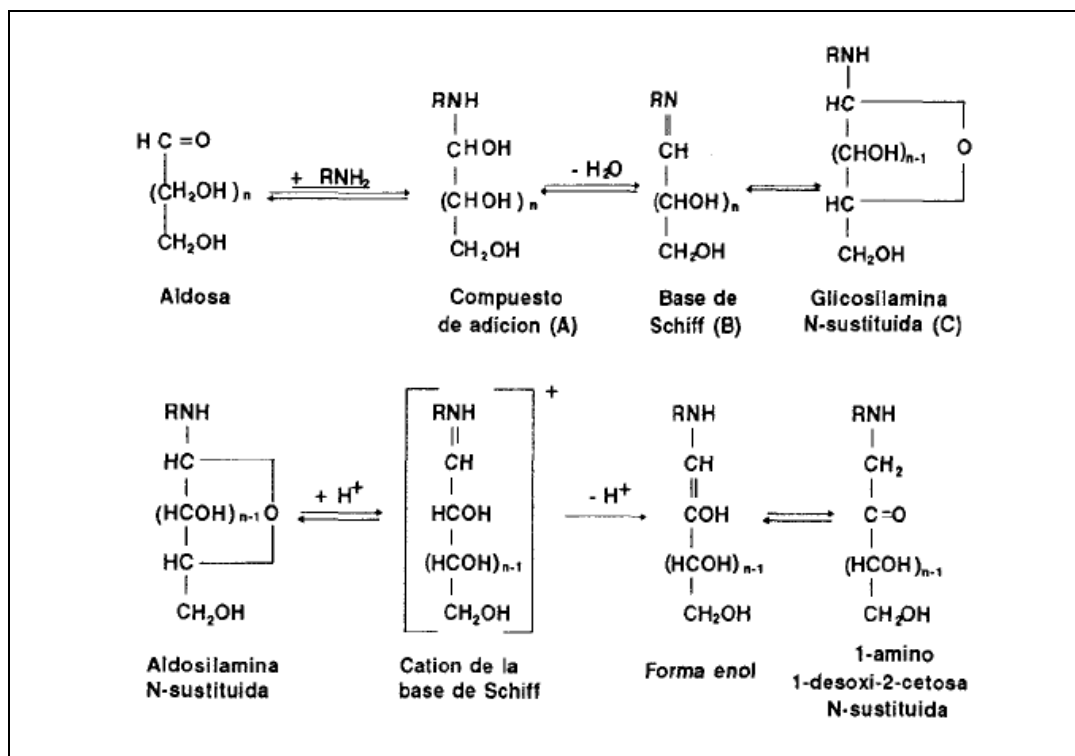


Figura 1.6 Esquema de las etapas iniciales de la reacción de Maillard. Formación de los compuestos de Amadori

El primer paso es una condensación entre el grupo ϵ -amino de la lisina y el grupo carbonilo de la lactosa o glucosa dando lugar al compuesto de adición (A). Esta reacción está catalizada por las bases que eliminan un protón del grupo amino que se comporta como nucleofílico. A continuación, el compuesto formado pierde una molécula de agua originando la base de Schiff (B), la cual se cicla y se transforma en una glicosilamina N-sustituida (C). Estos compuestos son poco estables, a excepción de los procedentes de aminoácidos aromáticos, y sufren un reordenamiento posterior, pasando por el catión de la base de Schiff, para formar la 1-amino-1-desoxi-2-cetosa correspondiente que es el primer compuesto irreversible de la reacción (lactulosil-lisina). Esta última reacción se conoce como reordenamiento de Amadori y es la que se produce normalmente en los alimentos. Existe sin embargo otro tipo de reordenamiento conocido como el de Heyns que tiene lugar cuando el azúcar reaccionante es una cetosa formándose la 2-amino-2-desoxi-aldosa correspondiente.

1.3.2.- Etapas intermedias

Las siguientes etapas de la reacción parten de la degradación de los compuestos de Amadori, y tienen lugar a través de dos vías fundamentales dependiendo del pH (Figura 1.7).

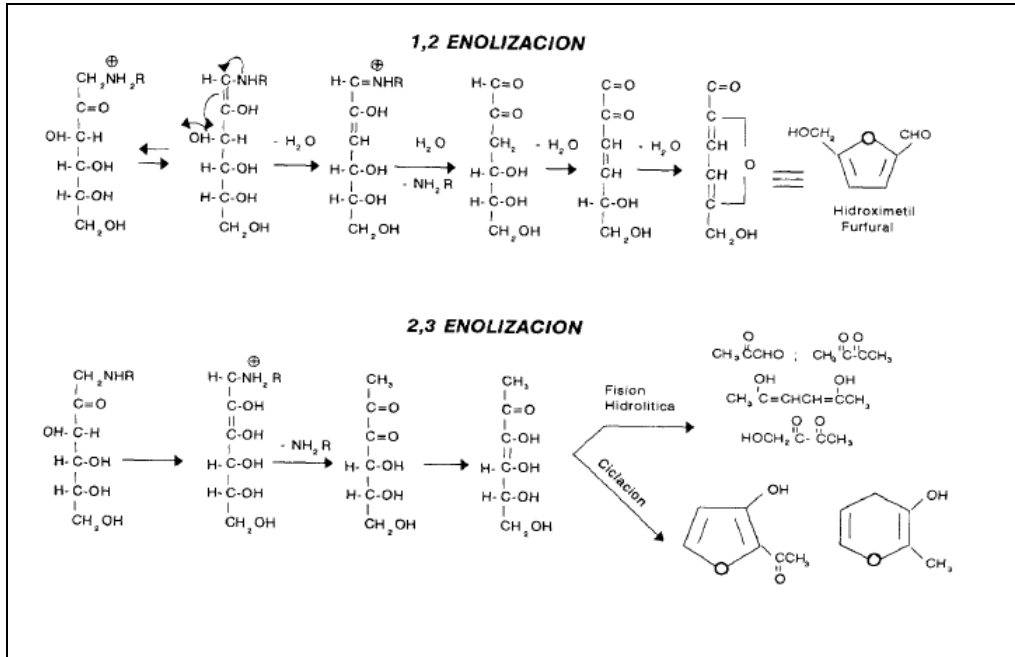


Figura 1.7. Esquema de las etapas intermedias de la reacción de Maillard. Degradación de los compuestos de Amadori.

A pH ácido esta favorecida la 1,2-enolización, que por pérdida del grupo hidroxilo en el C3, conduce a la formación de la 3-desoxiglicosulosa. La pérdida de un segundo hidroxilo en el C4 y posterior ciclación da lugar a derivados del hidroximetil-furfural como compuestos estables.

A pH básicos la reacción favorecida es la 2,3-enolización. La eliminación del grupo amino del C1 da lugar a la formación de la 1-desoxiglicosulosa, compuesto muy inestable. La enolización de este compuesto forma por hidrólisis, las reductonas y los compuestos dicarbonílicos, así como una variedad de o-heterociclos (furanos y piranos) por ciclación.

Los distintos compuestos formados en las dos vías de degradación sufren la reacción conocida como degradación de Strecker al reaccionar con los grupos amino libres, dando lugar a una gran variedad de compuestos volátiles, responsables de los distintos aromas y sabores típicos de los alimentos que han sufrido la reacción de Maillard. Dentro de estos compuestos se incluyen los pirroles, pirazinas, oxazoles y tiazoles.

1.3.3- Etapas finales

Las etapas finales de la reacción de Maillard son muy complejas y, aún hoy, poco conocidas. En ellas se incluyen reacciones de condensación aldólica y polimerización entre grupos aldehído y amino para formar, a partir de los precursores de bajo peso molecular antes mencionados, los polímeros nitrogenados de color marrón conocidos como melanoidinas.

1.3.4.- Factores que influyen en la reacción de Maillard

Los numerosos estudios realizados sobre la reacción de Maillard ponen de relieve la presencia de factores que actúan favoreciendo o inhibiendo la reacción. Entre estos factores se encuentran.

1.3.4.1.- Naturaleza y concentración de los reactantes

Los compuestos implicados en la reacción de Maillard son los azúcares reductores y los aminoácidos con grupos amino libres presentes en las proteínas.

En los primeros estudios de la reacción empleando sistemas modelo se observó que los monosacáridos son más reactivos que los disacáridos y estos, a su vez más que los oligosacáridos. Dentro de los monosacáridos las pentosas son más reactivas que las hexosas, y las aldosas más que las cetosas. En trabajos más recientes Kato y col. (1986) comprobaron que durante el calentamiento de ovalbúmina con varias aldohexosas y lactosa, el pardeamiento es mayor para la galactosa seguida de glucosa, y mucho menor con la utilización de lactosa. En el caso de las leches, se ha comprobado este hecho al comparar los resultados obtenidos durante el tratamiento térmico y la conservación de leches con lactosa hidrolizada (Burvall y col., 1978; Rawson y Mahoney, 1983). El pardeamiento es mucho mayor cuando la lactosa se encuentra hidrolizada, debido a la mayor reactividad de los monosacáridos resultantes.

La naturaleza de los aminoácidos también tiene una marcada influencia sobre la velocidad de la reacción, de todos ellos L-lisina es el más reactivo debido a la presencia de un grupo ϵ -amino libre. La β -Lactoglobulina,

debido a su composición aminoacídica posee 19 sitios susceptibles a la glicosilación (15 Lys, 3 Arg, y el NH₂-terminal) (Tabla 1.1). Ashoor y Zent (1984) hacen una clasificación de los aminoácidos según su reactividad en tres grupos:

- Pardeamiento alto (lisina, glicina, triptófano y tirosina)
- Pardeamiento intermedio (prolina, leucina, isoleucina, alanina, hidroxiprolina, fenilalanina, metionina, valina, glutamina y asparragina)
- Pardeamiento bajo (histidina, treonina, arginina, cisteína, ácido aspártico, y ácido glutámico).

1.3.4.2.- Actividad de agua (a_w)

En la conservación de alimentos desecados el efecto de la actividad de agua es de gran importancia en el desarrollo de la reacción de Maillard. En general se puede decir que un aumento de la actividad de agua supone un incremento en la velocidad de la reacción hasta alcanzar un máximo. Saltmarch y Labuza (1981) en un estudio sobre almacenamiento de seroproteínas en polvo, observan que el pardeamiento y la pérdida de lisina disponible son máximos a una a_w de 0,44, mientras que en el almacenamiento de leches en polvo el mayor grado de reacción de Maillard ocurre a una a_w de 0,6-0,7.

El rango de a_w en el cual la reacción de Maillard se ve favorecida ha sido descrito por los distintos autores entre 0,3-0,7 (Ben-Gara y Zimmerman, 1972; Burvall y col., 1978; Saltmarh y Labuza, 1981; Kato y col., 1986; Desrosiers y col., 1989). Actividades de agua muy elevadas conducen, sin embargo, a una inhibición del pardeamiento debido a un efecto de dilución de los reactantes. Actividades de agua en el rango de 0,2-0,3 se consideran adecuadas para la conservación, ya que las transformaciones son mínimas debido a que esta agua se encuentra fuertemente ligada y no está disponible para favorecer las interacciones entre los distintos componentes. Sin embargo, Narayan y Cross (1992) hacen un estudio de la interacción entre glucosa y α -acetil-lisina en un rango de actividad de agua de 0,19-0,21 y a 40, 50 y 60°C de temperatura, observando que el grado de reacción de Maillard es superior al que podría esperarse para estos contenidos de humedad

1.3.4.3.- pH

El pH y la capacidad tampón del sistema condicionan tanto la velocidad como los mecanismos de degradación de los compuestos de Amadori (Nursten, 1980). La influencia del pH en la velocidad del pardeamiento ha sido estudiada por un gran número de autores mediante el empleo de sistemas modelos, observándose que a pH básico, en el rango de 6-9, la reacción está favorecida. La disminución o el aumento del pH respecto a dicho rango suponen una disminución del pardeamiento al inhibirse determinadas reacciones, sobre todo a pH extremos. A pH ácido hay una disminución, y a pH básico la falta de protones necesarios para los reordenamientos de Heyns y Amadori dan lugar a una inhibición considerable.

1.3.4.4.- Otros factores

Metales como el cobre y el hierro parecen tener una acción favorecedora sobre la reacción de Maillard (Patton, 1955; Kato y col., 1986). Sin embargo, según Powel y Spark (1971) este efecto podría ser debido a variaciones del pH producidas por las sales.

Otro de los factores catalizadores de la reacción de pardeamiento son los iones fosfatos. Potman y Van Wijk (1989) realizaron un detallado estudio sobre sistemas modelo comprobando el efecto catalizador de dichas sales en el rango de pH de 5 a 7, efecto indicado ya por Patton en 1955.

Entre los compuestos que inhiben la reacción de Maillard, Patton (1955) incluye a formaldehído, bisulfito sódico, agua oxigenada y anhídrido sulfuroso. Igualmente se ha comprobado que el aumento de concentración de determinados aminoácidos como ácido glutámico, ácido aspártico y L-cisteína produce una inhibición del pardeamiento (Pokorny y col. 1988; Pham y Cheftel, 1990).

1.3.5.- Aspectos funcionales, nutricionales y toxicológicos de la glicosilación

La primera etapa de la reacción de Maillard modifica diferentes propiedades físicas y químicas de péptidos y proteínas tales como el tamaño, la forma, la composición, la carga neta y la distribución de cargas, la relación hidrofobicidad/hidrofilicidad, las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias, la flexibilidad o rigidez molecular y la capacidad de interactuar con otros componentes del alimento afectando las propiedades funcionales y la actividad biológica.

En la literatura científica reciente se encuentra un número creciente de trabajos relativos a la importancia que presenta la glicosilación de proteínas y su potencial uso como productos funcionales. Entre las proteínas glicosiladas se encuentran las proteínas de plasma (Matsudomi y col., 1995), proteínas de huevo como la ovoalbúmina (Kato y col., 1995; Handa y Kuroda, 1999; Matsudomi y col., 2002), la lisozima (Shu y col., 1998; Yeboah y col., 2000) y las proteínas miofibrilares de peces (Sato y col., 2003).

En el caso de las proteínas lácteas se observaron diferencias entre los carbohidratos utilizados para la glicosilación. Los derivados de las hexosas o la lactosa exhiben una mayor solubilidad y un aumento de las propiedades emulsificantes comparadas con los derivados de la ribosa y el gliceraldehído (Shida y col., 1994; Chevalier y col., 2001c). En sistemas modelo con β -Lactoglobulina, los derivados glicosilados de ácido glucónico presentaron una mayor solubilidad y estabilidad térmica con el tiempo de reacción, frente a derivados del ácido melibiónico- β -lactoglobulina (Kitabatake y col., 1985). Cuando se utilizó glucosa-6-fosfato (Aoki y col., 1997) o polisacáridos como ácido algínico (Hattori y col., 1997) la glicosilación provocó un aumento de la solubilidad y la estabilidad térmica respecto a las proteínas no glicosiladas. También se observaron aumentos en la estabilidad térmica y las propiedades emulsificantes por la conjugación con carboximetildextrano (Nagasawa y col., 1996; Hattori y col., 2000).

Para el caso de sistemas con β -lactoglobulina y lactosa a a_w bajas se detectó un aumento en la extensión de la glicosilación, observándose la existencia de diferentes estructuras de β -Lactoglobulina glicosilada (Morgan y col., 1999a y 1999b; Jones y col. 1998; Maubois y col. 1995). Otros autores compararon la glicosilación a una a_w de 0,65 y en solución observándose, en el primer caso, un mayor número de lactosas enlazadas y aumento en la solubilidad debido a la formación de dímeros de β -Lactoglobulina estabilizados mediante enlaces disulfuro. Por el contrario, cuando la reacción se llevó a cabo

en solución se obtuvo un nivel bajo de lactosas enlazadas, baja solubilidad y alteración en las etapas del proceso de desnaturalización - agregación térmica (Morgan y col., 1997, 1999a, 1999b; Bouhallab y col., 1999).

Durante la modificación de β -lactoglobulina con distintos polisacáridos se produjo una disminución de los efectos inmunogénicos de la misma, siendo esta proteína la causa principal de alergias en productos lácteos (Spies, 1976; Kobayashi y col., 2003 y 2001).

En el caso de las caseínas la modificación con glucosa y galactosa produce aumento en la solubilidad, en la viscosidad y mejora en las propiedades espumantes (Courthaudon y col., 1989; Closs y col., 1990). Cuando se modificó el caseinomacropéptido con lactosa no se detectaron diferencias en la solubilidad y la estabilidad térmica de los compuestos glicosilados comparados con la proteína sin glicosilar, pero sí un aumento de la actividad emulsificante (Moreno y col., 2002).

También se estudió la glicosilación de albúmina sérica bovina la cual presentó diferencias con la a_w y los monosacáridos utilizados (Yeboah y col., 1999).

La glicosilación de proteínas induce otras propiedades benéficas para el consumidor tales como actividad antioxidante de proteínas de suero en polvo calentadas (Browdy y Harris, 1997), actividad antimicrobiana y citotóxica (Chevalier y col., 2001b). Aunque durante este proceso los antioxidantes naturales son destruidos hay otros que son formados (Nicoli y col., 1997). Las propiedades antioxidantes de los productos de la reacción de Maillard fueron estudiados en sistemas modelo (Alais y col., 1997; Yoshimura y col., 1997).

Así también esta reacción puede reducir seriamente el valor nutritivo de los alimentos. Esto es debido a la destrucción de aminoácidos esenciales y a la formación de compuestos tóxicos y antinutritivos. El estudio de la toxicidad de los compuestos procedentes de la reacción de Maillard presenta grandes dificultades debido a la complejidad de las reacciones que tienen lugar. Pero es un tema de suma importancia en el que actualmente se está trabajando.

1.3.6.- Indicadores de la reacción de glicosilación

La formación de compuestos coloreados ha sido utilizada para determinar la extensión de la reacción de glicosilación en alimentos. Este método tiene poca aplicación en la actualidad debido a que tratamientos

térmicos moderados no producen un pardeamiento visible. Por todo esto son los compuestos originados en las primeras etapas los más estudiados. De los compuestos derivados de la reacción de Maillard, la lactulosil-lisina y sus productos de hidrólisis han sido los más analizados (Resmini y col., 1990; Delgado y col., 1992; Villamiel y col., 2000; López y Olano, 1999) (Figura 1.8).

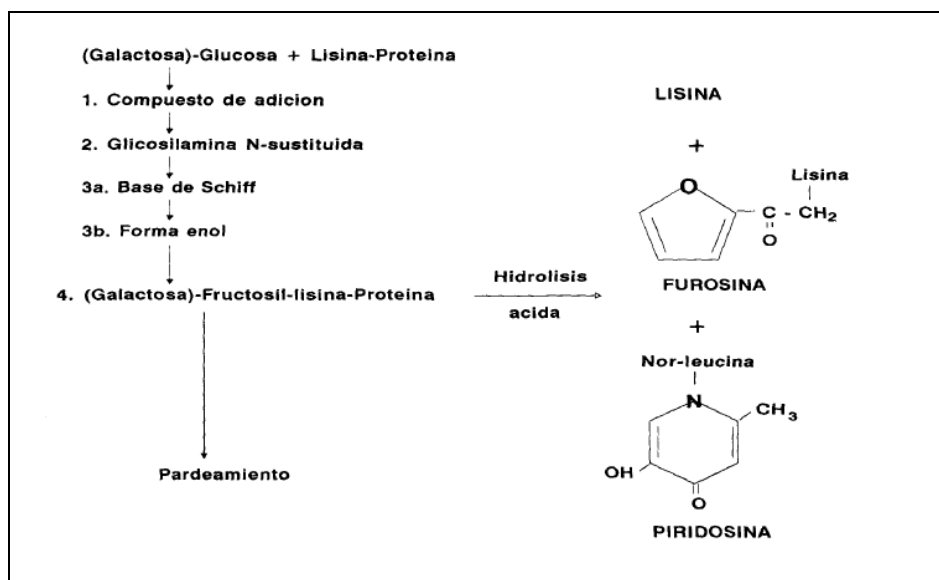


Figura 1.8. Esquema de las primeras etapas de la reacción de Maillard y de la formación de furosina y piridosina.

La furosina ha sido considerada, hasta el momento, como el indicador más valioso de la pérdida de valor nutritivo de la proteína ligada a los azúcares reductores como consecuencia de la reacción de Maillard en alimentos. Su medida es un índice de la cantidad de lisina ligada como lactulosil-lisina o fructosil-lisina y por tanto no disponible biológicamente (Evangelisti y col., 1994; Pizzoferrato y Manzi, 1998).

La furosina fue detectada por primera vez por Erbersdobler y Zucker (1966) en hidrolizados de leche en polvo sobreprocesada, como un pico desconocido que eluye detrás de arginina en los cromatogramas obtenidos en el análisis de aminoácidos. Bruggeman y Erbersdobler (1968) detectaron este mismo compuesto en hidrolizados de los productos de reacción resultantes del calentamiento de glucosa con lisina y en la hidrólisis de fructosil-lisina (ϵ -N-(1-desoxi-D-fructosil)-L-lisina). Finot y col. (1968) corroboraron los resultados de Erbersdobler y Zucker (1966) en muestras de leche y obtuvieron el mismo compuesto, el que identificaron como furosina (ϵ -N-(2-furoilmetil)-L-lisina) mediante su aislamiento, purificación por cromatografía en columna de

intercambio iónico y análisis de la estructura por espectrometría infrarroja, de masas, resonancia magnética nuclear y espectroscopia UV-visible.

Nakai y col. (1975) aislaron y purificaron la furosina a partir del calentamiento de caseína con glucosa. Los resultados obtenidos concuerdan con los de Finot y col. (1968) quienes encuentran un segundo pico procedente de la hidrólisis de fructosil-lisina, identificándolo como piridosina (ϵ -1,4-dihidro-6-metil-3-hidroxi-4-oxo-1-piridil)-L-norleucina). Su cuantificación, sin embargo, resulta complicada ya que eluye en una zona de gran solapamiento de compuestos.

1.4 Propiedades funcionales de proteínas

Cheftel y col. (1989) definen las propiedades funcionales de un componente como aquellas propiedades fisicoquímicas que determinan las características de los alimentos en los cuales se encuentran o son agregados. Las propiedades funcionales de un componente en particular no están relacionadas con sus propiedades nutricionales ni con la función biológica que pueda cumplir en la fuente de origen de donde es extraído, pero son propiedades que tienen una gran importancia desde el punto de vista tecnológico. Cheftel y col. (1993), clasifican las propiedades funcionales para las proteínas en tres grupos: *propiedades de interacción proteína-agua o hidratación* (solubilidad, absorción y retención de agua, viscosidad), *las propiedades de interacción proteína-proteína* (gelificación, texturización, formación de películas, entre otras) y *propiedades de superficie*, las cuales dependen de la interacción de la proteína con dos fases inmiscibles como aire/agua o aceite/agua. Dentro de estas últimas propiedades funcionales se encuentran el espumado y la emulsificación. Estos grupos están interrelacionados entre sí, ya que algunas propiedades funcionales pueden implicar más de un tipo de interacción, como por ejemplo la gelificación que depende tanto de la interacción proteína-proteína como de la interacción proteína-agua. La clasificación de las propiedades funcionales según el tipo de interacción no significa que dicha interacción sea la que exclusivamente se establezca, sino la que predomina. Incluso, en algunos casos, por ejemplo la viscosidad, tanto las interacciones macromolécula-solvente, como las que se establecen entre las macromoléculas son del mismo nivel de importancia para

la propiedad funcional y lo mismo sucede con el fenómeno de gelificación (Cheftel y col., 1993).

Cabe destacar que el concepto de propiedad funcional puede aplicarse a otros componentes normalmente presentes en los alimentos, como los hidratos de carbono y los lípidos.

Tabla 1.3. Propiedades funcionales de proteínas. (Phillips y col., 1994)

Propiedad General	Criterio funcional
Organoléptica	Color, aroma, sabor
Kinestésica	Textura, suavidad, arenosidad, turbidez, palatabilidad
Hidratación	Solubilidad, adsorción de agua, viscosidad, retención de agua, humectabilidad, gelificación, sinéresis
Superficial	Emulsificación, espumado, formación de películas
Fijación	Fijación de lípidos, fijación de aromas
Reológica/estructural	Elasticidad, cohesividad, dureza, masticabilidad, adhesividad, formación de redes, agregación, formación de masa, texturizabilidad, extrudabilidad

Las propiedades funcionales de una proteína están determinadas fundamentalmente por sus propiedades físicas, químicas y estructurales. Estas propiedades incluyen tamaño, forma, composición y secuencia aminoacídica, cociente hidrofiliicidad/hidrofobicidad, carga neta y su distribución, contenido y distribución de estructura secundaria (α -hélice, β -hoja, etc.) arreglos de estructura terciaria y cuaternaria de segmentos polipeptídicos, entrecruzamiento inter e intracatenarios por uniones disulfuro, grado de flexibilidad-rigidez de la proteína en respuesta a cambios externos y la capacidad de interactuar con, o repeler, otros componentes (Damodarán, 1989, 1996).

El método de obtención, las condiciones de procesamiento (acidez, fuerza iónica y particularmente tiempo y temperatura), naturaleza del medio (acuoso u oleoso), la composición y las características del medio al cual se aplican (pH, temperatura, fuerza iónica, etc.) y la interacción con otros componentes modifican las propiedades funcionales de las proteínas (Damodaran, 1989; Tolstoguzov, 1993). Estas modificaciones son simplemente una consecuencia de los cambios estructurales y conformacionales acaecidos

en la proteína debido a variaciones en factores ambientales (Damodaran, 1989).

Mientras algunas proteínas son capaces de desarrollar una única propiedad funcional por ejemplo la gelificación del colágeno, otras son capaces de exhibir una amplia gama de propiedades funcionales (Tabla 1.3). Los atributos sensoriales de los alimentos se deben a complejas interacciones entre varios ingredientes funcionales. Por tanto, para que una proteína sea útil, como ingrediente, en la elaboración de diversos alimentos debe poseer múltiple funcionalidad (Damodaran, 1996). Las proteínas de origen animal, como las de la leche, el huevo y la carne, son muy usadas en la elaboración de alimentos. Estas proteínas son mezclas de especies moleculares distintas, con propiedades fisicoquímicas muy diferentes y capaces de desempeñar numerosas funciones. Las proteínas de origen vegetal (por ejemplo las de soja y otras leguminosas y las de semillas oleaginosas) se usan en un grado limitado en los alimentos convencionales. Aunque estas proteínas son también mezcla de diversas especies moleculares, no se comportan tan bien como las proteínas animales en la mayor parte de los productos alimenticios (Damodaran, 1996).

El mejor conocimiento de la funcionalidad de una proteína puede obtenerse cuando el constituyente proteico del sistema modelo a ensayar es una proteína única, purificada y de estructura nativa conocida (Cheftel y col., 1989). Se han establecido unas cuantas correlaciones empíricas entre propiedades moleculares y ciertas propiedades funcionales en sistemas modelo. Sin embargo la mayor parte de los ingredientes proteicos disponibles para uso industrial son mezclas de proteínas que contienen apreciables cantidades de glúcidos, lípidos, sales minerales, polifenoles, etc. y además esos mismos compuestos son componentes de los alimentos reales, con los cuales las proteínas interaccionan. Aunque los aislados proteicos contienen menos constituyentes no proteicos, como fueron expuestos a ciertos tratamientos, a menudo drásticos, su estructura inicial y funcionalidad pueden resultar afectadas (Cheftel y col., 1989; Damodaran, 1996). Por otra parte durante la fabricación de los alimentos es factible que ocurra desnaturalización de proteínas (Damodaran, 1996). Todos esos fenómenos modifican el comportamiento funcional de las proteínas, por consiguiente la funcionalidad asociada con las características estructurales de cierta proteína no necesariamente evidenciará las propiedades del sistema alimentario. Por

otra parte ha sido observado experimentalmente que existen desviaciones significativas entre las propiedades de mezclas y las calculadas asumiendo la adición lineal de las propiedades individuales de los ingredientes (Arteaga y col., 1993; Arteaga y Nakai, 1993). Por tanto para el desarrollo de un nuevo producto donde se implementará el uso de proteínas con determinada funcionalidad, no es suficiente el estudio de las proteínas aisladamente. Se necesita además una evaluación experimental mediante pruebas que incluyen desde medidas concretas de propiedades fisicoquímicas bien definidas como ser viscosidad, tensión superficial, solubilidad, a simples ensayos sobre su aplicación como por ejemplo medir el volumen del pan después de la cocción o la pérdida de agua durante la cocción de hamburguesas. Entre estos dos tipos de ensayos se encuentran una serie de pruebas que pueden aplicarse a sistemas modelo como por ejemplo la medida de la capacidad emulsificante y estabilidad de la emulsión de una mezcla aceite-agua-proteína en unas condiciones concretas (Cheftel y col., 1989).

Carp (2001), propuso tres niveles de evaluación de la funcionalidad de una proteína:

- a) análisis a nivel molecular donde se estudia la estructura molecular, tipos de enlace, características eléctricas, características térmicas, etc.;
- b) en sistemas modelo, donde se utilizan pequeñas cantidades de muestra y la composición del sistema no es compleja.
- c) en sistemas reales donde se formula el alimento y se requieren mayores cantidades de muestra y el sistema es múltiple y complejo.

Todas estas estrategias tienen ventajas y desventajas. La evaluación en sistemas reales permite evaluar la contribución funcional de la proteína en el producto final, es indispensable en etapas de optimización y definición de la tecnología industrial de producción, pero los ensayos de utilización son costosos, exigen mucho tiempo y solo se tiene una información empírica del proceso. En los estudios con sistemas modelo se puede realizar una evaluación rápida y comparativa de proteínas de distinto origen o distintas tecnologías de obtención y es factible realizar ciertas correlaciones entre propiedades físicas y químicas de las proteínas y la funcionalidad estudiada, pero como las proteínas poseen multitud de propiedades físicas y químicas, es difícil delimitar el papel que cada una de ellas juega en una determinada propiedad funcional. (Damodaran, 1996). Además, como ya fue señalado, el comportamiento en los sistemas modelo no siempre es el mismo que en los

alimentos reales. El análisis a nivel molecular permite conocer las causas moleculares de la funcionalidad, esto es importante ya que permite proyectar las mejores técnicas de procesamiento, tanto en la obtención del ingrediente proteico como en la elaboración del propio alimento, para conservar o mejorar la funcionalidad. También, permite desarrollar estrategias para modificar las características conformacionales y estructurales de las proteínas alimentarias y así lograr la funcionalidad específica deseada (Scilingo, 2000). Cabe sin embargo señalar que predecir fiablemente las propiedades funcionales a partir de sus propiedades moleculares hasta el momento es dificultoso.

En la Tabla 1.4 se muestran las relaciones existentes entre las propiedades moleculares, funcionales y estructurales de las proteínas.

Tabla 1.4. Relación entre las propiedades funcionales, moleculares y estructurales de las proteínas. (Damodaran, 1989)

Propiedades moleculares	Propiedades funcionales	Propiedades estructurales
Hidrodinámicas	Viscosidad, Gelificación	Forma, tamaño
Superficie	Solubilidad	Composición aminoacídica
	Espumado	Distribución aminoacídica
	Emulsificación	Flexibilidad molecular
	Retención de lípidos	

A nivel empírico, las diversas propiedades funcionales de las proteínas pueden considerarse como una manifestación de dos aspectos moleculares de las mismas: a) las propiedades hidrodinámicas, b) las propiedades relacionadas con la superficie (Damodaran, 1996). Algunas propiedades funcionales como la viscosidad, la gelificación y la texturización, están relacionadas con las propiedades hidrodinámicas de las proteínas que dependen del tamaño, la forma y la flexibilidad molecular. Otras como la humectabilidad, la dispersabilidad, la solubilidad, las propiedades espumantes, emulsionantes y de fijación de saborizantes están relacionadas con las propiedades químicas y topográficas de la superficie de las proteínas.

1.4.1. Propiedades funcionales de superficie

Numerosos alimentos naturales y procesados son espumas o emulsiones. Estos sistemas dispersos son inestables, a menos que en la interfase se sitúe una sustancia anfifílica apropiada. Las proteínas son moléculas anfifílicas y migran espontáneamente a la interfase aire-agua o aceite-agua. Esa migración espontánea de las proteínas desde la fase líquida a la interfase indica que la energía libre de las proteínas es menor en la interfase que en la fase acuosa. Por tanto, cuando se establece el equilibrio, la concentración de proteína en la región interfacial es siempre superior a la que tiene en la fase acuosa. A diferencia de los agentes tensoactivos de bajo peso molecular, las proteínas forman una película muy viscoelástica en la interfase. Esta película resiste los choques mecánicos durante el almacenamiento y la manipulación y por esta razón las espumas y las emulsiones estabilizadas por proteínas son más estables que las preparadas con agentes tensoactivos de bajo peso molecular (Damodaran, 1996).

1.4.1.1. Tensión superficial y área superficial.

Durante la formación de emulsiones y espumas hay un aumento de área interfacial o superficial con el consecuente incremento de la energía libre del sistema, por lo tanto, las espumas y las emulsiones son termodinámicamente muy inestables (Walstra, 1989). En la interfase entre un líquido y un gas se genera una tensión denominada tensión superficial σ , comúnmente expresada en mN/m o dinas/cm que es una consecuencia del desequilibrio de fuerzas sobre las moléculas situadas en una superficie. Si se considera un sistema aire-agua, las moléculas de agua situadas en la interfase son muy diferentes de las situadas dentro de la masa de la disolución, experimentando distintos efectos de las fuerzas intermoleculares (Figura 1.9). Las moléculas tienden a moverse hacia el interior de la masa acuosa, puesto que una molécula de agua en esta posición tiene una energía potencial menor que en la interfase. Esta fuerza que impulsa a la molécula de agua situada en la superficie a moverse hacia el interior se denomina tensión superficial (Wong, 1989).

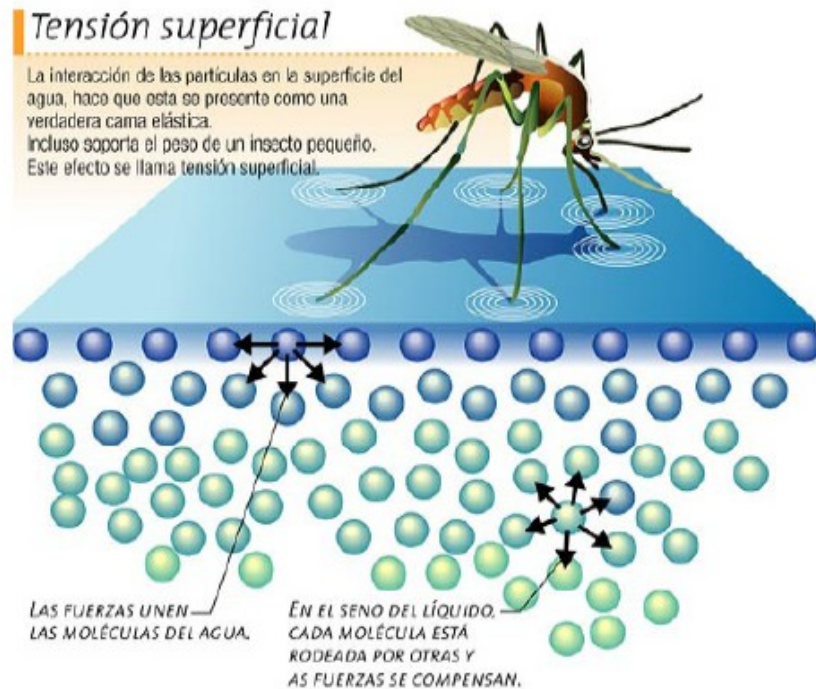


Figura 1.9 Moléculas de agua en una interfase aire-agua.

De la misma manera, en la interfase entre dos líquidos inmiscibles (A y B) se produce una tensión interfacial γ_{iAB}

$$\gamma_{iAB} = \gamma_A - \gamma_B \quad (1.1)$$

donde γ_A y γ_B son las tensiones interfaciales de los líquidos A y B, respectivamente, y γ_{iAB} es la tensión interfacial entre A y B.

La variación de la energía libre (ΔG) del sistema esta dada por:

$$\Delta G = \gamma_i \Delta A \quad (1.2)$$

donde ΔA es el área superficial o interfacial.

1.4.1.1.1 Adsorción de proteínas en interfases

La disolución de una sustancia en agua puede aumentar (sales) o disminuir (surfactante) la tensión superficial o interfacial. Las sustancias tensoactivas son aquellas que por su naturaleza anfifílica se adsorben en la interfase agua-aceite o agua-aire y reducen la tensión de la misma. Las proteínas, por tener en sus moléculas tanto dominios hidrofóbicos como

hidrofílicos, son sustancias que exhiben propiedades superficiales (Walstra, 1989).

Las proteínas experimentan cambios conformacionales significativos en la interfase esto es previsible pues la conformación de las proteínas es una manifestación de su interacción intramolecular y con el medio. Esto puede involucrar un descenso neto en su energía libre comparada con la que tienen en el seno de la fase. Desde que la conformación secundaria y terciaria de una proteína en una interfase es dificultosa de descifrar, esas configuraciones son comúnmente descritas en términos de “trenes”, “bucles” y “colas” (Figura 1.10).

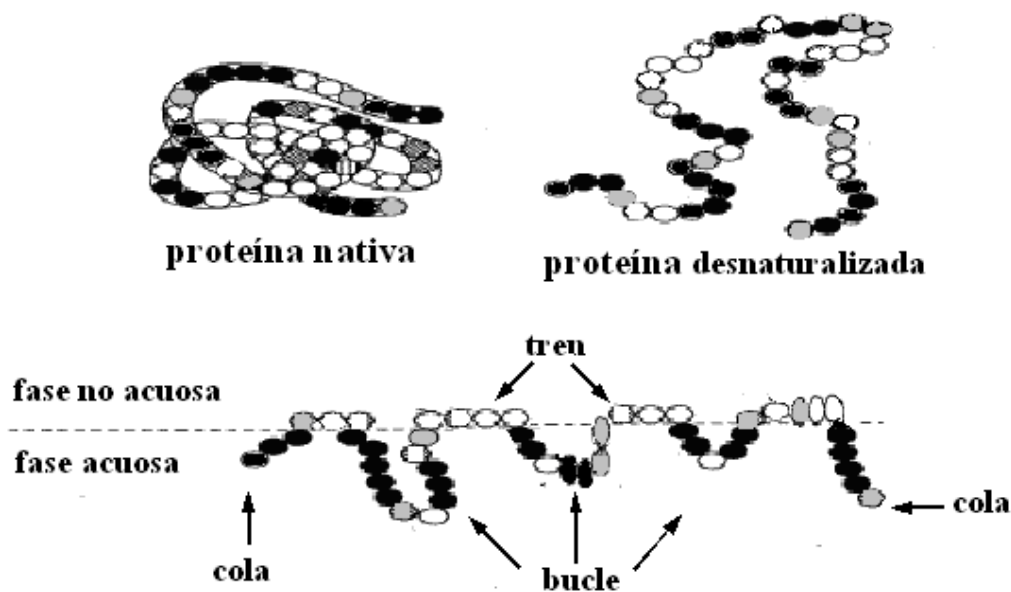


Figura 1.10. Representación esquemática de la conformación de una proteína en una interfase. Residuos de aminoácidos polares (●), no polares (○) y neutros (◐). Tomado de Panizzolo, 2005 (Adaptado de Phillips, 1977)

Los “trenes” son los segmentos hidrofóbicos que yacen planos sobre la interfase, haciendo contacto con las fases acuosa y no acuosa (aire o aceite). Los “bucles” son los segmentos de polipéptidos entre los “trenes” y las “colas” son los segmentos N y C terminal, ambos invariablemente situados dentro de la fase acuosa. La distribución relativa de “trenes”, “bucles” y “colas” en la molécula adsorbida determina las propiedades de las emulsiones y espumas. Si los “trenes” son la conformación predominante, entonces, la proteína ejercerá una alta presión superficial. Para que esto ocurra la proteína deberá ser altamente flexible e hidrofóbica. La estabilidad de las emulsiones de este tipo de proteínas, sin embargo puede no ser mejor que la de aquellas que forman más bucles como las proteínas globulares (Damodaran, 1997).

La disminución de tensión interfacial por las proteínas se expresa mediante el concepto de presión superficial o interfacial (π), la cual se define como:

$$\pi \text{ (mN/m)} = \gamma_0 - \gamma \quad (1.3)$$

donde γ_0 es la tensión interfacial de las fases puras, es decir, la tensión superficial de un líquido en equilibrio con su vapor (interfase líquido-aire) o la tensión interfacial de un líquido en contacto con agua (en un sistema líquido-líquido), y γ es la tensión superficial o interfacial en presencia de proteína (McClements, 1999).

Por otra parte, la acumulación de proteína en la interfase debido al proceso conocido como adsorción interfacial se caracteriza por medio de la concentración superficial o interfacial (Γ):

$$\Gamma \left(\frac{\text{mg proteína}}{\text{m}^2} \right) = \frac{m}{A} \quad (1.4)$$

donde m es la cantidad de proteína presente en la interfase y A el área total interfacial.

La cinética de adsorción de una proteína en la interfase se evalúa mediante la variación de la tensión o presión interfacial en el tiempo. La adsorción de una proteína en la interfase se produce en tres etapas: la difusión de las moléculas proteicas, la adsorción en la interfase y el reordenamiento de las moléculas ya adsorbidas (Tornberg y col., 1982). La tensión interfacial disminuye hasta llegar a un valor mínimo, la tensión interfacial de equilibrio (γ_e). Por consiguiente, la presión interfacial de equilibrio alcanza un valor máximo dado por:

$$\pi_e \text{ (mN/m)} = \gamma_0 - \gamma_e \quad (1.5)$$

donde π_e es la presión interfacial de equilibrio.

El equilibrio se establece entre la velocidad de adsorción y la de desorción de la proteína en la interfase. Este equilibrio, que es de naturaleza dinámica, está casi totalmente desplazado hacia la adsorción interfacial por que esta situación es energéticamente más favorable. En este caso, se llega a una situación donde todo el espacio disponible en la interfase se satura formando una monocapa, que da lugar al film interfacial. En dispersiones proteicas muy concentradas, el exceso de proteína puede adsorberse en

multicapas, dependiendo principalmente de la naturaleza de las interacciones que se establecen entre las moléculas de proteína adsorbidas en la monocapa y las que provienen del medio acuoso (McClements, 1999).

Por estudios de espectroscopia infrarroja y dicroísmo circular, se demostró que los cambios conformacionales más importantes durante la adsorción interfacial de una proteína se dan a nivel de la estructura terciaria y cuaternaria (van Aken, 2003). La estabilización de la monocapa o multicapas tiene lugar por interacciones de tipo no covalente, pero si en la secuencia aminoacídica existen grupos sulfhidrilos libres pueden ocurrir reacciones de intercambio disulfuro-sulfhidrilo en la interfase, formando un film interfacial resistente y de alta viscoelasticidad que contribuye a la estabilidad (Damodaran, 2005).

Para ser considerados buenos agentes interfaciales, las proteínas deben poseer otras propiedades: flexibilidad molecular, solubilidad e hidrofobicidad superficial. La flexibilidad molecular es la capacidad que tiene la proteína de sufrir cambios conformacionales rápidos cuando es transferida de un medio a otro medio diferente. Durante la preparación de una emulsión o una espuma, el transporte de la proteína a la interfase se realiza por convección más que por difusión (Walstra, 1993). Por tal motivo, los cambios conformacionales rápidos en la interfase son esenciales para que las proteínas orienten sus residuos aminoacídicos hidrofílicos e hidrofóbicos hacia la fase acuosa y dispersa, respectivamente. La solubilidad es otro requisito fundamental para que una proteína sea un buen agente superficial. Las proteínas poco solubles quedan dispersas en forma de agregados en la fase acuosa y pierden totalmente la flexibilidad estructural, lo cual afecta notablemente su capacidad de adsorción interfacial. Por lo tanto, las condiciones en las cuales las proteínas pueden perder solubilidad, como la cercanía del punto isoelectrico, no son adecuadas para la preparación de emulsiones o espumas. Por último, la hidrofobicidad superficial es otra propiedad importante: los residuos aminoacídicos hidrofóbicos de una proteína generalmente se ubican en el interior de la estructura globular, pero muchos también pueden estar en contacto con el medio acuoso. La cantidad de “parches” hidrofóbicos en la superficie de la molécula de la proteína juega un rol sumamente importante en el anclaje inicial de la misma en la interfase aceite/agua, es decir en la fase de penetración durante la adsorción (Kato y Nakai, 1980).

La afinidad de un agente emulsificante por la interfase se define mediante los conceptos de eficiencia de adsorción y actividad superficial. La eficiencia de adsorción es una medida de la mínima cantidad de agente emulsificante requerida para la saturación de la interfase, mientras que la actividad superficial es el valor de presión superficial que se alcanza cuando la interfase se satura. Estos parámetros dependen marcadamente de la estructura molecular de los agentes emulsificantes y de las condiciones del entorno (pH, fuerza iónica). A la misma concentración molar, las proteínas tienen mayor eficiencia de adsorción que los agentes surfactantes de bajo peso molecular, porque en su estructura molecular hay varios sitios hidrofóbicos que interactúan favorablemente con la fase lipídica, de manera que se requiere menor concentración molar para que se produzca la saturación de la interfase (McClements, 1999). Por otro lado, a concentraciones donde se produce la saturación de la interfase, las moléculas de agentes surfactantes de bajo peso molecular producen un incremento de la presión superficial más elevado que las proteínas y por lo tanto tienen mayor actividad superficial. Esto se atribuye a su empaquetamiento más eficiente en la interfase debido a su estructura molecular más simple (McClements, 1999; Damodaran, 2005).

Cuando una proteína y un agente emulsificante no proteico (u otra proteína diferente) se adicionan al sistema antes de la preparación de una emulsión, pueden competir por la adsorción en la interfase. Este hecho se denomina *adsorción competitiva*, tiene lugar en muchas emulsiones alimentarias y no siempre conduce a sistemas más estables. Si a una emulsión formulada con proteínas se adiciona un agente emulsificante no proteico, como resultado de la adsorción competitiva, puede producirse el desplazamiento total de las proteínas en la interfase. Esto sucede cuando el dodecil sulfato de sodio (SDS) se adiciona a una emulsión, siempre que la relación SDS/proteína sea elevada. El empaquetamiento de una proteína en la interfase no es homogéneo debido principalmente a su complejidad estructural, por lo tanto, en la interfase existen espacios vacíos. Cuando las moléculas de SDS se adicionan a la fase continua, inicialmente se adsorben en estos espacios vacíos debido a su bajo peso molecular y a medida que pasa el tiempo estos dominios interfaciales ricos en moléculas de surfactante crecen en el tiempo y comprimen el film proteico. A presiones interfaciales suficientemente elevadas (debido a la adsorción de moléculas de surfactante), el film proteico pierde su integridad y se produce la desorción de la proteína

(Mackie y col., 2003). Este mecanismo de desplazamiento, llamado mecanismo orogénico de desplazamiento (“orogenic displacement mechanism”) también puede aplicarse con el mismo razonamiento a otros agentes surfactantes de bajo peso molecular (Damodaran, 2005). Este mecanismo constituye la base de algunas técnicas de caracterización de emulsiones que se aplicarán a lo largo de este trabajo.

1.4.1.1.2 Propiedades reológicas superficiales de las proteínas adsorbidas en interfases

En la formación de espumas y emulsiones, la capacidad de respuesta de la interfase a una perturbación o la manera en la que se alcanza un nuevo estado de equilibrio son en general, más importantes que el estado de equilibrio mismo

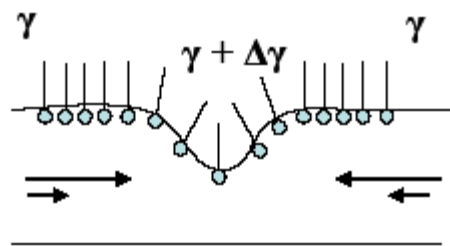


Figura 1.11. Respuesta de una interfase a una perturbación. Las flechas indican la dirección del líquido interfacial y del seno de la disolución.

La respuesta de una interfase a una perturbación de su estado de equilibrio se describe de manera esquemática en la Figura 1.11. En esta se observa como un incremento del área interfacial tiende a producir una zona en la que la densidad interfacial es menor y por ello, la tensión interfacial también aumenta localmente ($\Delta\gamma \geq 0$). Las áreas de alta tensión interfacial tienden a contraerse a expensas de las áreas de menor tensión interfacial con el fin de reducir el exceso de la energía interfacial del sistema. Por tanto, el gradiente de tensión interfacial produce movimiento de la interfase y el seno de la disolución se mueve para contrarrestar la perturbación. En general, los efectos mecánicos producidos por un gradiente de tensión interfacial en una interfase reciben el nombre de “Efectos de Marangoni”. El primer paso hacia la interpretación cuantitativa de estos fenómenos lo constituye la definición de

Gibbs de la elasticidad superficial como el cambio en la tensión superficial por unidad de cambio relativo de área interfacial:

$$\varepsilon \text{ (mN/m)} = \frac{d\gamma}{d \ln A} \quad (1.6)$$

donde ε es la elasticidad límite de Gibbs y γ es la tensión superficial

Gibbs definió este parámetro inicialmente para la superficie de un líquido estabilizado por una película de jabón, pero ha resultado ser adecuado para expresar gradientes de tensión interfacial en cualquier interfase líquido-fluido (Lucassen-Reynders, 1993). Este parámetro ε se denomina “elasticidad de Gibbs” o “elasticidad límite de Gibbs”. El término “módulo dilatacional interfacial” se utiliza para el caso más general en el cual la interfase tiene un comportamiento viscoso además de elástico ante una deformación. La componente viscosa refleja la existencia de procesos de relajación en, o cerca de, la interfase. Así, el módulo ε es una medida de la resistencia que opone una interfase a la creación de regiones de alta tensión interfacial y de la velocidad a la que los gradientes de tensión interfacial desaparecen una vez que cesa la perturbación sobre la interfase (Lucassen-Reynders y Kuijpers, 1992)

En un caso general en el que se somete a una interfase a una perturbación pequeña de área ΔA , la respuesta en tensión interfacial originada, $\Delta\gamma$, se puede escribir como la suma de la contribución elástica y viscosa:

$$\Delta\gamma = \varepsilon d \Delta \ln A + \eta d \Delta \ln A \quad (1.7)$$

donde εd es la elasticidad dilatacional interfacial y ηd es la viscosidad dilatacional interfacial.

Si la deformación es suficientemente pequeña y lenta, los coeficientes εd y ηd serán constantes. En este caso, comparando las ecuaciones 1.6 y 1.7 se obtiene la expresión general del operador matemático, módulo dilatacional

$$\varepsilon = \varepsilon d + \eta d \quad (1.8)$$

Esta condición se consigue usualmente en experimentos en los que se imponen oscilaciones de tensión y densidad interfacial al sistema alrededor de sus valores en condiciones de equilibrio. En estos experimentos, la amplitud y la velocidad de la oscilación pueden ser controladas fácilmente. Así pues, en

un experimento oscilatorio, el operador d/dt operaría sobre un desplazamiento interfacial dado por una función de onda:

$$\Delta \ln A \propto \exp(ift) \quad (1.9)$$

donde f es la frecuencia angular de la oscilación. El módulo dilatacional interfacial para el caso de oscilaciones periódicas es una magnitud compleja dada por la siguiente expresión:

$$\varepsilon = \varepsilon' + if\eta_d \quad (1.10)$$

En esta expresión, la parte real, también llamada módulo de almacenamiento, coincide con la elasticidad interfacial dilatacional mientras que la parte imaginaria, que también se denomina módulo de pérdida, es proporcional a la viscosidad interfacial dilatacional. El carácter complejo de esta magnitud, se refleja experimentalmente en una diferencia de fase que aparece entre el cambio en tensión interfacial, $\Delta\gamma$, y el cambio en área interfacial, ΔA , dada por φ , de tal forma que los componentes elástico y viscoso del módulo dilatacional, se pueden expresar también en función de este desfase.

$$\varepsilon_d = |\varepsilon| \cos \varphi \quad (1.11)$$

$$\eta_d = |\varepsilon| \sin \varphi \quad (1.12)$$

En la bibliografía existen multitud de dispositivos experimentales que permiten medir el módulo dilatacional interfacial de capas de proteínas o surfactantes adsorbidas en interfases líquido-fluido. En función de las características del dispositivo, la frecuencia de ondulación puede variar en varios órdenes de magnitud (Benjamins y Lucassen-Reynders, 1998).

El módulo dilatacional interfacial contiene una importante información estructural acerca de la capa interfacial de moléculas adsorbidas. Sin embargo, debido a la multitud de fenómenos que afectan a esta magnitud, la correcta interpretación de las curvas experimentales es muy compleja y por ello resulta muy complicado extraer esta información de los resultados experimentales (Freer y col., 2004; Benjamins y Lucassen-Reynders, 1998). Cada uno de los parámetros dilatacionales contiene información relacionada con la resistencia que opone la capa interfacial a la deformación. Cuando se encuentra un máximo en la elasticidad interfacial, gráfica elasticidad

interfacial en función de la presión interfacial, este se identifica con un cambio estructural de la capa adsorbida. Si se estudia la pendiente de la parte lineal se la puede relacionar con el grado de compactación, un aumento de la pendiente esta relacionado con una disminución de la flexibilidad de la molécula en la interfase (Benjamins y Lucassen-Reynders, 1998; Benjamins y col., 1996).

Por el contrario, la detección de un componente viscoso en la capa interfacial indica que en ella tienen lugar procesos de relajación como son el intercambio difusivo de moléculas en la capa interfacial con moléculas en el seno de la disolución y en el caso de películas formadas por macromoléculas, reorganización estructural molecular en la capa interfacial o fenómenos de colapso (Williams y col. 1997; Benjamins y Lucassen-Reynders, 1998)

Existen dos casos límite, accesibles experimentalmente y que facilitan la interpretación de los resultados en los que la película interfacial tiene un comportamiento dilatacional puramente elástico (Lucassen-Reynders, 1993).

- 1- Monocapa insoluble: En el caso de una monocapa insoluble se supone que no existe intercambio difusivo entre la capa interfacial y el seno de la disolución. Además, en este caso, la oscilación se realiza lo suficientemente lenta, de forma que la escala temporal en la que tiene lugar cualquier proceso de relajación en la interfase es mucho menor que el período de la oscilación. Así, la capa interfacial cumple que $\Gamma A = \text{cte}$ y la interfase se encuentra siempre en condiciones de equilibrio pues se adapta de manera inmediata a la deformación. En este caso, la elasticidad interfacial toma un valor límite dado por:

$$\varepsilon_0 = \frac{d\gamma}{d \ln \Gamma} \quad (1.13)$$

- 2- Capa adsorbida puramente elástica. En este caso sí que puede existir un intercambio difusivo de moléculas entre la capa interfacial adsorbida y las moléculas en el seno de la disolución al producirse la deformación de la interfase. Una manera de evitar que se produzca este intercambio es realizar la perturbación lo suficientemente rápida como para que la interfase no tenga tiempo de responder a la perturbación impuesta. Por ello, en este caso límite, no hay tiempo de que se produzcan procesos de relajación en

la interfase y la viscosidad superficial que presenta el sistema en estas condiciones es despreciable. Así, la capa interfacial adsorbida se comporta una vez más como insoluble y la elasticidad interfacial se puede relacionar con las propiedades en equilibrio de la capa interfacial, haciendo uso de la Ecuación 1.13

Las propiedades dilatacionales de las películas de proteínas adsorbidas ó de surfactantes de bajo peso molecular son muy diferentes. En términos generales, los surfactantes de baja masa molecular (MM) difunden rápidamente a la interfase y forman películas, denominadas móviles, en las que una interfase libre es rápidamente ocupada por una molécula de surfactante. Por el contrario, las proteínas son moléculas grandes, que difunden lentamente y que forman películas interfaciales, denominadas inmóviles, pero muy resistentes debido a la gran interacción intermolecular existente entre las proteínas adsorbidas en la capa interfacial (Wilde, 2000). Por ello, la interpretación de las curvas experimentales de los parámetros dilatacionales de las películas de proteína adsorbida en interfases líquido-fluido es más compleja que la de los surfactantes de baja MM.

En este trabajo, se ha hecho uso de un modelo teórico, propuesto por Panizzolo 2005, que se detalla en el capítulo siguiente para la interpretación de las curvas experimentales de propiedades dilatacionales de capas de proteína adsorbida en interfase líquido-fluido o aire-líquido con el fin de extraer un máximo de información estructural de las mismas.

1.4.1.2. Emulsiones y espumas

En términos generales, las emulsiones y las espumas son dispersiones que presentan numerosas analogías entre ellas. En cualquier caso se va a realizar una descripción general de cada una de ellas por separado.

1.4.1.2.1. Espumas

Una espuma es una dispersión de burbujas de gas en un líquido. Si se la analiza en forma comparativa con una emulsión, se puede ver que en la espuma el volumen de una burbuja de gas es cinco órdenes de magnitud mayor que el correspondiente a las gotas de aceite de una emulsión (diámetro de burbuja: 0,1-3 mm; diámetro de gota de aceite: 0,1-100 μm). La tensión

superficial γ_s , en una burbuja de espuma generalmente es mayor que 30 mN/m, mientras que en una gota de emulsión la tensión interfacial γ_i puede llegar a valores tan bajos como 0,1 mN/m. Además, la diferencia de densidad entre fase continua y fase dispersa es 10^3 kg/m^3 para la espuma, comparando con 10^2 kg/m^3 como máximo para la emulsión. Estas características de la espuma la hacen mucho más inestable que una emulsión (Halling, 1981).

Las características finales de una espuma están íntimamente relacionadas con las propiedades de las películas líquidas que la forman así como con las propiedades dilatacionales de las películas de moléculas adsorbidas en la superficie. El proceso de formación de una espuma (o capacidad espumante) y la estabilidad de la misma son dos fenómenos que no se pueden evaluar de manera independiente puesto que paralelamente a la formación de una espuma tienen lugar mecanismos de desestabilización de la misma que la van destruyendo (Langevin, 2000). Sin embargo, para facilitar la comprensión, veamos estos dos fenómenos separadamente.

1.4.1.2.1. 1.- Formación de espumas

El proceso de formación de espuma consiste en incorporar gas a una solución proteica con creación de una nueva área interfacial o sea formar burbujas rodeadas por una película proteica. Así pues, tres factores fundamentales afectan a este fenómeno: la cantidad de moléculas en el medio, la velocidad de adsorción de las moléculas sobre la superficie y las propiedades dilatacionales de la capa de moléculas adsorbida. Veamos esto en detalle.

En primer lugar, es evidente que la capacidad espumante de una disolución aumenta con el número de moléculas anfífilas accesibles en el medio ya que la concentración superficial se incrementa con la concentración de partículas en el seno de la disolución (Carrera- Sánchez y Rodríguez-Patiño, 2005).

En segundo lugar, la dinámica de adsorción de las moléculas juega un papel importantísimo en la capacidad espumante de las mismas. Cuando se crea una superficie, la velocidad con la cual las moléculas se sitúan en ella es un factor determinante en la formación de una espuma. Las proteínas pequeñas, flexibles y desordenadas poseen una mayor capacidad espumante

que las proteínas grandes y globulares debido a su más rápida difusión a la superficie (Damodaran, 1990).

Finalmente, para una correcta formación de la espuma, es necesario que cuando una superficie se expande, la nueva superficie creada sea rápidamente ocupada por moléculas. Este fenómeno está directamente relacionado con la viscosidad superficial de la capa de moléculas adsorbida puesto que este parámetro mide precisamente la habilidad de la película para responder a un cambio en área (Durand y col., 1999; Langevin, 2000). Una viscosidad superficial muy alta implica que el sistema se opone a la deformación inducida en la capa superficial y por tanto la creación de área superficial se ve favorecida y con ello la formación de una espuma.

Una espuma se puede obtener por diferentes métodos. Por sobresaturación de un líquido con gas, por disolución de gas bajo presión y liberando después el gas por descenso de la presión o por formación de gas in situ. Por medios mecánicos como la inyección de gas a través de un orificio estrecho (burbujeo) o por batido o agitación con cantidad ilimitada de gas (Wagner, 2000).

1.4.1.2.1. 2.- Estabilidad de espumas

El proceso de desestabilización de una espuma consiste en la tendencia de la fase gaseosa discontinua a formar una fase continua por aproximación y fusión de las burbujas, a fin de alcanzar un área superficial mínima (mínima energía libre). A este proceso se opone la película proteica superficial, que como barrera mecánica es más efectiva cuanto mayores son su viscoelasticidad y su rigidez (Wagner, 2000).

Los mecanismos de desestabilización de una espuma están gobernados principalmente por:

- Drenado de líquido. En primera instancia esto ocurre por simple acción de la gravedad sobre el líquido que se encuentra en las burbujas. Luego por fenómenos más complejos debido a la diferencia de curvatura entre los bordes de Plateau y la parte plana de las películas, que producen un gradiente de presión que se puede expresar según la ley de Laplace como:

$$\Delta P \propto \gamma \left(\frac{1}{Ra} - \frac{1}{Rb} \right) \quad (1.14)$$

donde R_a y R_b son los radios de curvatura del borde Plateau y de la lamela, respectivamente (Figura 1.12 y 1.13). Esta diferencia de presión (ΔP) es la fuerza motriz que desplaza el líquido de la lamela interburbuja hacia los bordes de Plateau, mediante un mecanismo que es llamado succión capilar, el líquido seguidamente es drenado por acción de la gravedad desde los bordes de Plateau hacia la parte inferior de la espuma. Este tipo de inestabilidades implican una deformación de la película, de manera que la resistencia de la película a la deformación inducida por el drenaje es clave en la estabilidad de la misma. Al contrario que en el caso de la formación de una espuma, la estabilidad de la misma está determinada por la elasticidad superficial de la película. Este parámetro cuantifica la resistencia a la deformación de manera que películas muy elásticas serían capaces de resistir el drenaje de líquido.

- Colapso de la espuma por ruptura de lamelas ocurre al debilitarse las mismas por disminución de su espesor (por drenado o evaporación de líquido), o por presencia de partículas.
- Desproporción o maduración de Ostwald que ocurre cuando las burbujas grandes crecen a expensas de las pequeñas por difusión de gas a través de la lamela, debido a la diferencia de presión entre ellas (que surge también de la aplicación de la ecuación 1.14 donde ahora R_a y R_b son los radios de curvatura de las burbujas pequeña y grande respectivamente). En consecuencia, este mecanismo se encuentra favorecido en el caso de sistemas muy polidispersos. Esto conduce además a que las burbujas asuman una forma poliédrica por compresión de unas contra otras siendo las hexagonales más estables. Otro factor importante que afecta a la maduración de Ostwald es la solubilidad del gas en la fase líquida. Si el gas utilizado en la formación de una espuma es muy soluble en la fase acuosa, como el caso del dióxido de carbono (CO_2), la difusión del gas entre burbujas se ve claramente favorecida. La utilización de gases menos solubles en agua como el nitrógeno (N_2) en la formación de espumas, aumenta significativamente la estabilidad de la misma.

Todos estos mecanismos de desestabilización ocurren simultánea y sinérgicamente (Halling, 1981; Walstra, 1989; Langevin, 2000).

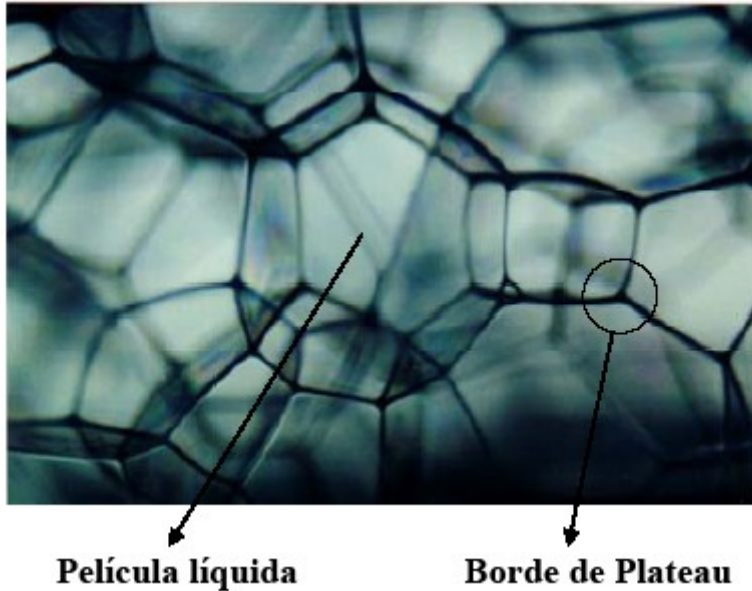


Figura 1.12 Imagen de espuma real (<http://www.itt.edu/wasan/ftdes.html>)

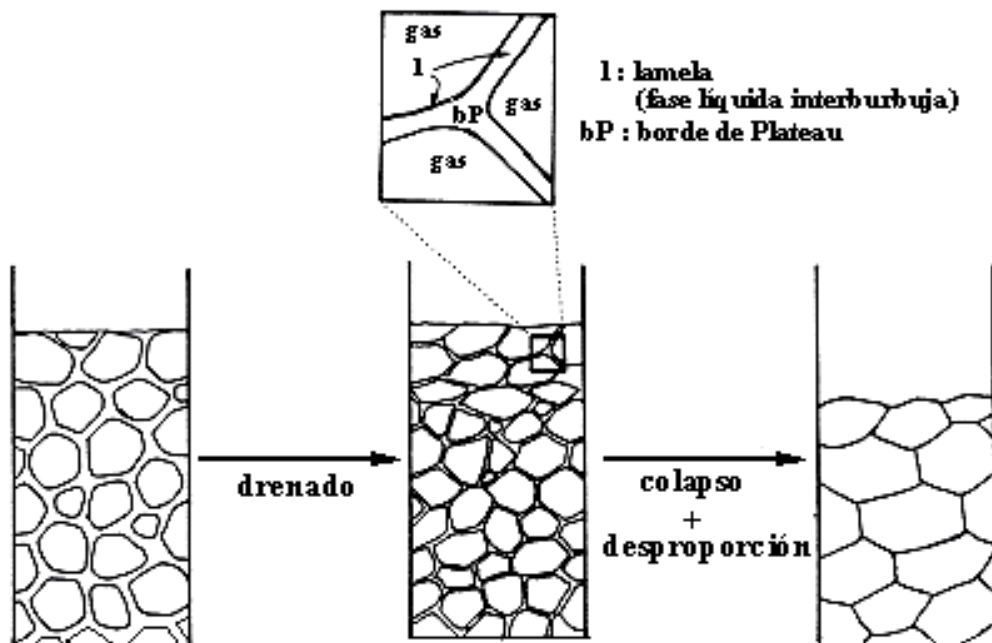


Figura 1.13. Representación esquemática de los procesos de desestabilización de una espuma y vista ampliada de la película interburbujas (Wagner, 2000).

1.4.1.2.2.- Emulsiones

Una emulsión es una dispersión de gotas de un líquido en otro que se denomina fase continua. Los mecanismos de formación y estabilidad de una emulsión son similares a los descritos en el caso de una espuma, sección 1.4.1.2.1, pese a la diferencia estructural entre ambos sistemas. Veremos a continuación los principales aspectos que caracterizan a este tipo de dispersiones.

1.4.1.2.2.1.- Formación de emulsiones

El convertir dos líquidos inmiscibles en una emulsión se denomina homogeneización, y el dispositivo diseñado para llevar a cabo este proceso recibe el nombre de homogeneizador. Para realizar una distinción según la naturaleza de los materiales de partida es conveniente clasificar la homogeneización en dos categorías. La creación de una emulsión a partir de dos fases líquidas separadas se denomina homogeneización primaria, mientras que el proceso de reducir el tamaño de las gotas en una emulsión ya existente o pre-emulsión se denomina homogeneización secundaria. (Figura 1.14). La creación de un tipo particular de emulsión puede involucrar una homogeneización primaria, secundaria o una combinación de ambas (McClements, 1999).

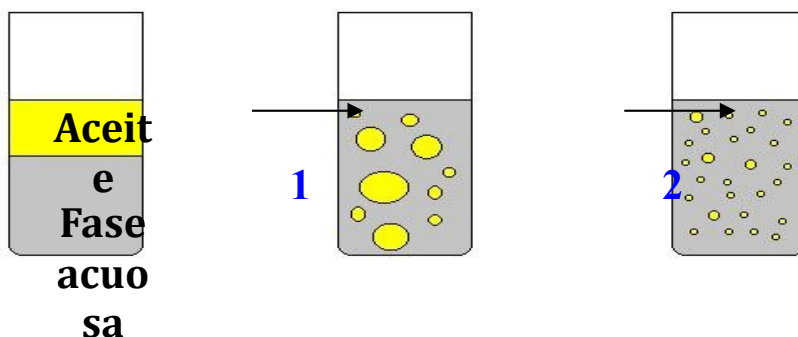


Figura 1.14: Representación esquemática del proceso de homogeneización para una emulsión aceite en agua (o/w): Homogeneización primaria (1) Homogeneización secundaria (2) Tomado de Palazolo, 2006.

La formación de gotas en una emulsión es un proceso que requiere energía, la que es suministrada por el homogeneizador. Durante la formación de las gotas a partir de la interfase entre dos líquidos el área interfacial A aumenta considerablemente, de manera que la energía libre superficial del sistema se incrementa en una cantidad $\gamma \cdot \Delta A$, donde γ es la tensión interfacial. Sin embargo la formación de gotas no es el único proceso que tiene lugar durante la preparación de una emulsión. Se pueden distinguir tres procesos críticos: formación y ruptura de las gotas, adsorción del agente emulsificante en la interfase y coalescencia de las gotas (McClements, 1999).

Durante el proceso de homogeneización primaria, la interfase entre las dos fases líquidas inmiscibles se deforma en tal grado que comienzan a producirse gotas, en su mayoría, de tamaño muy grande. Estas gotas deben deformarse y romperse para formar gotas de menor tamaño, por fuerzas de ruptura. Las gotas de un líquido en otro que es inmiscible tienden a adoptar una forma esférica para minimizar la energía libre interfacial.

La fuerza interfacial responsable de la forma esférica está dada por la ecuación de Laplace:

$$\Delta P_L = \frac{4 \cdot \gamma}{D} \quad (1.15)$$

donde ΔP_L es la diferencia de presión entre el interior y el exterior de la gota, γ es la tensión interfacial y D es el diámetro de la gota. Las fuerzas interfaciales ejercen una presión hacia el interior que es mayor cuanto menor es el diámetro de las gotas y menor la tensión interfacial.

El agente emulsificante es necesario para la formación de la emulsión y para ello debe adsorberse en la interfase, disminuyendo la tensión interfacial. Este proceso disminuye la presión de Laplace (ecuación 1.15), lo cual facilita la deformación y en consecuencia, la ruptura en gotas de menor tamaño. Además, la formación del film interfacial desfavorece la coalescencia de las gotas recién formadas (Figura 1.14).

El transporte de las moléculas del agente surfactante hacia la interfase durante el proceso de homogeneización no está determinada por difusión sino por convección (Walstra, 1993). Por lo tanto, es sumamente importante que el agente emulsificante recubra la interfase creada en una escala de tiempo similar a la del proceso de homogeneización. En caso de que la adsorción sea

muy lenta en comparación con la capacidad del homogeneizador de generar área interfacial, se produce el proceso de coalescencia de las gotas recién formadas. Esto determina que el proceso de formación de la emulsión no sea eficiente (Ford y col., 1997).

1.4.1.2.2.1.1- Homogeneizadores

En el mercado existen muchos tipos de homogeneizadores. La elección de un homogeneizador particular depende del volumen de emulsión que se desea preparar, la naturaleza de los materiales de partida, el tamaño de gota deseado y el costo (McClements, 1999).

Entre los principales tipos de homogeneizadores utilizados a escala industrial y de laboratorio encontramos los homogeneizadores de baja (≈ 3000 r.p.m.) y de alta velocidad (hasta 25000 rpm.), que son adecuados para producir emulsiones a partir de las fases líquidas separadas. El mecanismo de ruptura es un efecto combinado de fuerzas viscosas bajo un régimen de flujo laminar y turbulento. Al tener baja densidad de energía (ϵ) producen emulsiones de tamaño de gota relativamente grande. Los homogeneizadores que tienen diseño rotor/estator de alta velocidad (Ultraturrax® – Polytron®) son más efectivos que los de diseño a cuchilla. Debido al número elevado de revoluciones del rotor, las fases líquidas a procesar se aspiran axialmente y se presionan a través de las ranuras del conjunto rotor/estator. El movimiento de alta velocidad a través de las ranuras produce el esfuerzo de corte responsable de la ruptura de las gotas.

Los molinos coloidales son adecuados para la homogeneización de emulsiones de alta viscosidad y tienen un diseño rotor/estator igual que los homogeneizadores de alta velocidad. La intensidad del esfuerzo de corte en este dispositivo se puede regular por variación de la distancia entre el rotor y el estator. Aunque se pueden homogeneizar fases inicialmente separadas, son más eficientes para la reducción del tamaño de gota.

Los homogeneizadores a válvula de alta presión son sólo eficaces en reducir el tamaño de gota de una emulsión preexistente y por ende, realizan una homogeneización secundaria. A través de una bomba, la pre-emulsión es forzada a pasar a través de una válvula a presión elevada (entre 10 y 50 MPa). Las gotas de gran tamaño se rompen por un efecto combinado de flujo turbulento y cavitación. En muchos equipos, la presencia de una segunda

válvula regulada a una presión más baja, favorece la obtención de emulsiones de gota de distribución de tamaño de gota monomodal.

En los homogeneizadores ultrasónicos, la fuente convierte el voltaje suministrado (energía eléctrica) en ondas ultrasónicas (hasta 20 kHz) que se transmiten al seno del líquido y producen millones de cavidades microscópicas. El colapso de estas cavidades genera ondas de choque que producen deformación y ruptura de las gotas. La temperatura dentro de las cavidades es extremadamente alta, la presión, superior a 500 atmósferas. Sin embargo los tiempos de vida media de las cavidades están en el orden de los microsegundos, con lo cual la energía liberada por cada cavidad es mínima. La alta densidad de energía de este dispositivo de homogeneización se atribuye al efecto acumulativo del gran número de cavidades generadas. Hay distintos diseños para uso de laboratorio (piezoeléctricos, puntas sonicadoras) e industrial (generación de campo ultrasónico por aguja vibrante) (McClements, 1999).

En los homogeneizadores de membrana la fase dispersa se hace pasar forzosamente a través de una membrana porosa de vidrio o cerámica. El pasaje forzado a través de los pequeños orificios de la membrana produce el esfuerzo de corte necesario mientras el agente emulsificante disperso en la fase acuosa se adsorbe en la superficie de las gotas generadas. El tamaño de gotas producido depende de la rapidez con la que el agente emulsificante se adsorbe en la interfase. La principal característica de la homogeneización con membranas es la formación de emulsiones de distribución de tamaño monomodal.

1.4.1.2.2.2.- Estabilidad de emulsiones

Desde el momento que se forma una emulsión, inmediatamente después de la homogeneización, y a veces durante, comienza el proceso de desestabilización el cual tiende a disminuir el área interfacial y llegar al estado termodinámico más estable, las fases separadas. Existen distintos mecanismos que contribuyen simultánea y sinérgicamente a la desestabilización y son la consecuencia de distintos fenómenos físicos los cuales se relacionan con la diferencia de densidad de las fases continua y dispersa, las interacciones coloidales entre las gotas y la estructura y viscoelasticidad del film interfacial (McClements, 1999).

Los mecanismos que afectan la estabilidad de una emulsión están esquematizados en la Figura 1.15 y se denominan, maduración de Ostwald, sedimentación/cremado, floculación y colaescencia

El cremado y la sedimentación se conocen conjuntamente como fenómenos de separación gravitacional. El cremado describe el movimiento ascendente de las gotas debido a la menor densidad de la fase dispersa respecto a la de la fase continua, mientras que la sedimentación describe el movimiento de las gotas en sentido contrario, precisamente también por un efecto de diferencia de densidad. En general, aunque no de manera exclusiva, el cremado es más común en emulsiones o/w y la sedimentación en emulsiones w/o. Durante el proceso de cremado se forma una fase inferior o suero, la cual está empobrecida en gotas y una fase superior enriquecida en gotas, la fase crema (Figura 1.15).

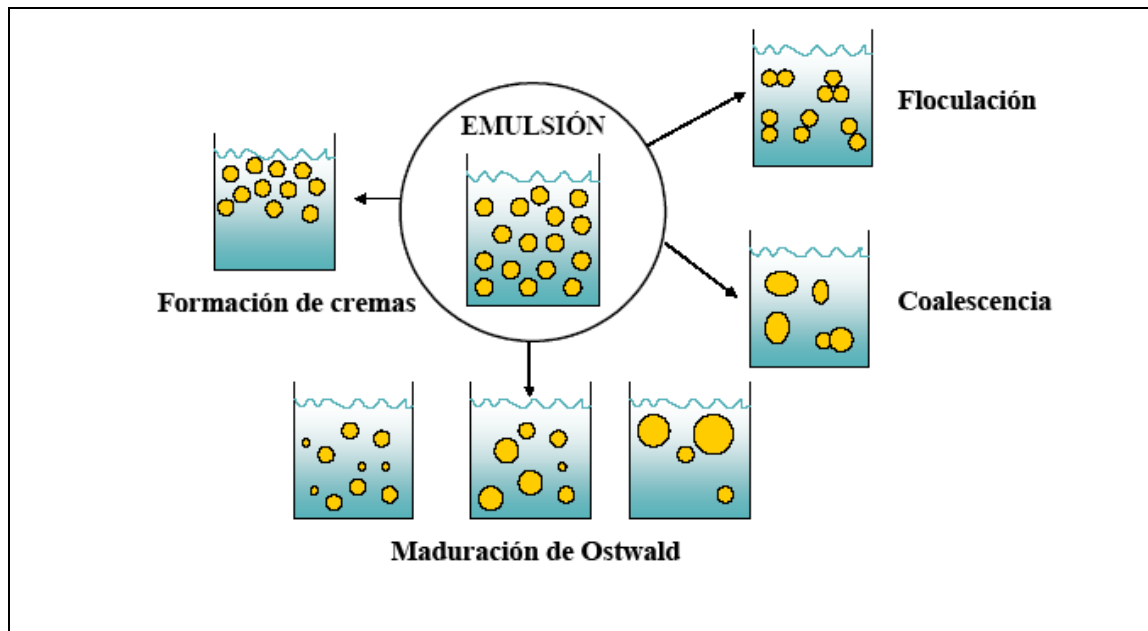


Figura 1.15. Mecanismos de desestabilización de una emulsión

La importancia del cremado en la industria alimentaria es muy alta y se estima que el 40 % del costo de desarrollo de nuevas emulsiones alimentarias se atribuye a la realización de ensayos de estabilidad frente a este mecanismo, porque da el primer indicio visual de la desestabilización (Robins, 2000). La velocidad de cremado de una emulsión (v) puede evaluarse a través de la ley de Stokes:

$$v = \frac{2 \cdot R^2 \cdot \Delta\delta \cdot g}{9 \cdot \eta} \quad (1.16)$$

donde R es el radio de las gotas, $\Delta\delta$ es la diferencia de densidad entre la fase continua y dispersa y η es la viscosidad del medio. Según la ley de Stokes, la velocidad es directamente proporcional al cuadrado del radio de las gotas, a la diferencia de densidad e inversamente proporcional a la viscosidad del sistema. Sin embargo, esta ley tiene muchas limitaciones para describir el comportamiento de las emulsiones. Las más importantes se describen a continuación:

- 1- En primer lugar las emulsiones son siempre polidispersas (en el mejor de los casos, tienen una distribución de tamaño de gota monomodal, lo cual no implica un único tamaño de gotas, por lo tanto, hay diferentes “poblaciones” de gotas de distinto tamaño y por ende, con una velocidad de cremado diferente. La velocidad de cremado de las gotas más pequeñas podría frenar el movimiento de las gotas de mayor tamaño, especialmente en emulsiones de alto ϕ).
- 2- La ecuación 1.16 no tiene en cuenta el movimiento browniano, debido a la agitación térmica ($E = kT$). Por un efecto entrópico, este movimiento tiende a distribuir las gotas de manera uniforme en el seno de la emulsión, lo que se opone al movimiento ascendente de las gotas. El efecto es importante si el diámetro de las mismas es menor a $1 \mu\text{m}$ (McClements, 1999).
- 3- Dado que la ley de Stokes predice la velocidad de cremado “a dilución infinita” no tiene en cuenta el efecto de un aumento en ϕ (o ϕ_m) ni las interacciones coloidales entre las gotas en la emulsión. La magnitud con la que se dan estas interacciones puede determinar la formación de flóculos, por lo que la velocidad de cremado se puede dar en mayor o menor grado de lo que podría predecir la ecuación 1.16.
- 4- El film interfacial está altamente hidratado, debido a la interacción de las moléculas de agua con los restos aminoácidos polares de las proteínas en la interfase. El efecto es particularmente importante en gotas de menor

tamaño, en la que la magnitud de espesor del film interfacial es importante respecto al diámetro de la gota. En ese caso, la densidad de las gotas es más cercana a la de la fase continua circundante, efecto que retarda la velocidad de cremado.

- 5- La velocidad de cremado podría disminuir drásticamente durante el almacenamiento estacionario si la fase continua tiene un comportamiento no-newtoniano, con una alta viscosidad o con un umbral de fluencia (la emulsión se comporta como sólido en reposo y como fluido por la aplicación de un esfuerzo de corte), aún cuando el diámetro de las gotas no sea demasiado pequeño. Esto sucede normalmente en emulsiones alimentarias como la mayonesa y aderezos.

En una emulsión o/w el cremado, se puede estudiar por distintos métodos. Según su naturaleza, estos métodos pueden ser destructivos o no destructivos.

En los métodos destructivos, se producen modificaciones permanentes en la emulsión, de manera que la misma no puede volver a utilizarse para una nueva medición. Los métodos no destructivos son más adecuados para evaluar la cinética de cremado. Los métodos no destructivos pueden clasificarse en métodos mono-dato y multi-datos (Robins, 2000). En los métodos mono-dato se obtiene un solo parámetro a un determinado tiempo, mientras que los métodos multi-dato permiten obtener un perfil de datos originado a partir de un barrido o “scanning” de la muestra. En muchos casos, el proceso de floculación puede darse de manera simultánea al de cremado, por lo que estos métodos evalúan la cinética de cremado-floculación.

La floculación es la aproximación e interacción de las gotas entre sí, que conduce a la formación de agregados o flóculos. En este agregado, cada gota mantiene su forma e identidad. La formación de un agregado estable ocurre cuando las fuerzas atractivas entre las gotas son mayores que las repulsivas. La velocidad de este proceso depende entonces de la naturaleza de los grupos constitutivos de la película interfacial. Las interacciones atractivas proceden de interacciones de van der Waals e hidrofóbicas y las de repulsión de interacciones electrostáticas repulsivas y repulsión estérica entre las capas adsorbidas (Damodaran, 1997; McClements, 1999; Wagner, 2000).

En emulsiones preparadas con proteínas como agentes emulsificantes puede producirse la floculación por un mecanismo de puenteo (“bridging flocculation”). Cuando una proteína se adsorbe en la interfase toma configuraciones de “trenes“, “bucles” y “colas” (Israelachvili, 1992). La floculación se da cuando las “colas” de una molécula de proteína adsorbida en la interfase de una gota interaccionan con la interfase de otra gota (Tornberg y col., 1997). La concentración interfacial de proteína es el factor dominante que gobierna este mecanismo. Sin embargo, también depende de las propiedades de la proteína: peso molecular, grado de disociación, flexibilidad molecular e hidrofobicidad superficial (Tornberg y col., 1997). Para una proteína dada hay una concentración proteica interfacial donde la floculación es máxima. Por debajo de esa concentración, la homogeneización es ineficiente debido al predominio de la coalescencia, obteniéndose emulsiones de tamaño de gota elevado. A concentraciones altas de proteína la floculación por puenteo es inhibida (Dickinson y col., 1997). Durante el proceso de homogeneización, el transporte de las moléculas de proteína a la interfase es por convección (Walstra, 1983); si la proteína no se adsorbe suficientemente rápido en relación a la creación de área interfacial, también puede darse la floculación. Hay que destacar que la floculación por puenteo es irreversible en condiciones de dilución y no tiene lugar en emulsiones estabilizadas por agentes surfactantes no proteicos debido a que su estructura no es tan compleja como de las proteínas (Tornberg y col., 1997).

El mecanismo de floculación por puenteo también puede darse en emulsiones en donde las proteínas cubren eficientemente el área interfacial creada. Sucede cuando las proteínas tienen una afinidad elevada por ciertos tipos de cationes (por ejemplo, Ca^{2+}), los mismos pueden servir de “puente” para la interacción entre las gotas. Los iones producen el apantallamiento (“screening”) de las interacciones de repulsión electrostática entre las moléculas de proteína adsorbidas, favoreciendo la agregación (Ye y Singh, 2001). La floculación por puenteo puede favorecerse también por efecto de un hidrocoloide sin o con muy poca actividad interfacial. La adición de polisacáridos en las emulsiones tiene por objeto aumentar la viscosidad de la fase continua, con lo cual se logra controlar el cremado. Sin embargo, con algunos polisacáridos este efecto sólo es logrado a altas concentraciones (Mc Clements, 1999; Damodaran, 2005). A concentraciones relativamente bajas

las moléculas de polisacárido pueden interactuar fuertemente con las de proteína, favoreciendo la floculación (Dickinson y col., 1989).

Cuando la floculación por puenteo es irreversible en condiciones de dilución, puede estudiarse por técnicas como la microscopía óptica y confocal (Tornberg y Ediriweera, 1988; Mc Clements, 1999), la turbidimetría y determinación de la distribución de tamaño de gota en ausencia y presencia de SDS (Ye y Singh, 2001; Antón y col., 2002; Relkin y Sourdet, 2005). En este último caso, las condiciones de alta dilución y agitación provocan la ruptura de los flóculos inestables, dejando sólo aquellos que resisten dichas condiciones. En muchos casos, las técnicas de dispersión de luz no dan el verdadero tamaño de los flóculos (Mc Clements, 1999). A pesar de estas limitaciones y de que los diámetros promedio obtenidos no sean valores absolutamente fidedignos, este método se utiliza en gran extensión (Ye y Singh, 2001; Antón y col., 2002; Relkin y Sourdet, 2005). Como conclusión, hay que destacar que los flóculos que se determinan son aquellos estables en las condiciones de medición.

Existe un segundo mecanismo de floculación conocido como floculación por depleción o por agotamiento (“depletion flocculation”) que también fue propuesto para el caso de emulsiones con polisacáridos (McClements, 1999). La adición de un polisacárido a las emulsiones induce la floculación por agotamiento por un efecto de volumen de exclusión. Cuando el espacio entre gotas adyacentes es más pequeño que el volumen hidrodinámico termodinámicamente más estable del polisacárido, el polímero es excluido del espacio entre las gotas. Esto establece un gradiente de concentración local y por ende, un gradiente de presión osmótica que induce la floculación (Damodaran, 2005).

La coalescencia es el proceso por el cual dos gotas se encuentran y se produce la ruptura de la película interfacial de manera que forman una gota más grande. En consecuencia, este proceso es irreversible y viene determinado por la elasticidad de la película interfacial adsorbida que se opone a la deformación/ruptura de la misma (Carrera –Sánchez y Rodríguez Patino, 2005; Langevin, 2000; Wilde, 2000). Para que este proceso ocurra, las gotas deben estar lo suficientemente cercanas entre sí. Este hecho es más probable que se dé en emulsiones que presentan un alto grado de floculación o cuando se ha formado la fase crema (Damodaran, 2005).

Cuando dos gotas se acercan hay una capa delgada de fase continua (o lamela) que tiene un determinado espesor. Cuando este espesor disminuye por debajo de un valor crítico se produce la coalescencia. Por lo tanto, la estabilidad frente a la coalescencia en una emulsión será mayor cuanto más elevado sea el espesor de la lamela que separa a las gotas. La magnitud de este espesor está gobernada por dos fuerzas de carácter opuesto. En primer lugar, la presión dentro de una gota de la fase dispersa es superior a la de la fase continua en una magnitud que está dada por la ecuación de Laplace (ecuación 1.15). La otra fuerza es la presión de desprendimiento o de separación (“disjoining pressure”). Cuando dos gotas están desprovistas de agente emulsificante, por ejemplo agua y aceite, la presión de separación es despreciable y las gotas coalescen fácilmente por colapso del film interfacial cuando se acercan debido a la presión de Laplace. Sin embargo, cuando las mismas están cubiertas con un agente emulsificante, las interacciones coloidales entre las moléculas adsorbidas crean una presión de separación que tiende a incrementar el espesor de la lamela. Por lo tanto, la magnitud y naturaleza de las interacciones coloidales son de importancia fundamental para determinar si una emulsión es estable o no frente a la coalescencia.

En los casos en que una emulsión es sometida a esfuerzos de corte (por ejemplo un trabajo mecánico como es la agitación) la viscoelasticidad del film es de suma importancia para impedir la coalescencia. En una emulsión en reposo, las gotas también están en continuo movimiento y colisionan unas con otras, sin embargo, bajo condiciones de trabajo mecánico, la frecuencia y eficiencia de colisión entre las gotas puede aumentar considerablemente. El esfuerzo de corte puede producir deformación en el film interfacial el cual genera hoyos y posterior ruptura en el mismo, dando lugar a la coalescencia (Lucassen-Reynders, 1993; Damodaran, 2005). En general los films interfaciales estabilizados por proteínas son más resistentes a los esfuerzos de corte que los estabilizados por agentes emulsificantes no proteicos, aún cuando éstos tienen mayor actividad superficial (Mc Clements, 1999; Damodaran, 2005).

Por otra parte, cuando la fase dispersa cristaliza parcialmente, el esfuerzo de corte acelera el proceso de coalescencia parcial. Esto es deseable en la elaboración de emulsiones alimentarias derivadas de la leche, como son las cremas heladas, la crema de leche o la manteca. Dado que en estas emulsiones los films interfaciales son muy resistentes por estar estabilizados

por proteínas, fundamentalmente por caseína, a fin de lograr una desestabilización controlada se adicionan agentes emulsificantes no proteicos conocidos como demulsificantes, los cuales disminuyen la viscoelasticidad del film interfacial induciendo la coalescencia parcial durante el batido o agitación.

La coalescencia puede evaluarse por los mismos métodos utilizados para el estudio de la floculación, porque en ambos procesos hay un aumento del tamaño de partícula. Sin embargo, al ser un mecanismo de desestabilización más lento, se recurre a los métodos acelerados: centrifugación, efectos combinados de almacenamiento y centrifugación, y fuerzas mecánicas.

La desproporción de Ostwald es causada por un transporte por difusión de fase dispersa desde las gotas más pequeñas a las más grandes en una emulsión. El efecto es el crecimiento de las gotas más grandes a expensas de las más pequeñas. En la práctica, es muy difícil distinguir este proceso del de coalescencia. Sin embargo, la insolubilidad del aceite en la fase acuosa impide el transporte difusional por lo que este mecanismo es más importantes en otros sistemas dispersos, como las espumas donde el gas de las burbujas puede difundir a través de la fase acuosa. La presencia de sustancias hidrosolubles en la fase oleosa dispersa (alcoholes, ácidos grasos de cadena corta) puede inducir en las emulsiones un cierto grado de desproporción (Friberg, 1997; McClements, 1999).

La inversión de fase es un proceso en el cual se produce un cambio desde una emulsión aceite en agua (o/w) a una emulsión agua en aceite (w/o) y viceversa. Este mecanismo de desestabilización es muy importante en la manufactura de algunos productos alimenticios, como la margarina y la manteca (Dickinson y Stainsby, 1988). La base de este fenómeno es muy compleja y se cree que involucra aspectos fisicoquímicos de la floculación, coalescencia, coalescencia parcial (cuando las gotas son semicristalinas) y formación de emulsiones. Después de la inversión de fase las propiedades de la emulsión pueden cambiar considerablemente; esta ha sido la base para la determinación de la capacidad emulsificante (CE) de una proteína (Swift y col., 1961; Jiménez Colmenero y García-Matamoros, 1981).

Los mecanismos de desestabilización no ocurren de manera separada o aislada. Una emulsión puede desestabilizarse simultáneamente por distintos mecanismos, dependiendo de la viscosidad de la fase continua, el tipo de

agente emulsificante empleado y su concentración inicial en la fase acuosa (u oleosa), la magnitud de ϕ (o ϕ_m), la adición de componentes (sales, azúcares), el pH y la aplicación de distintos tratamientos, como ser trabajo mecánico, ciclos de temperatura y congelación. En este caso, no se han incluido los mecanismos químicos de desestabilización, producto de procesos tales como la oxidación lipídica o alteración por crecimiento microbiano. Los cambios químicos en algunos componentes de la emulsión pueden favorecer la desestabilización de una emulsión por mecanismos físicos (McClements, 1999).

Hipótesis

En base a lo expuesto precedentemente en la Introducción se espera que la β -Lactoglobulina glicosilada presente propiedades funcionales mejoradas respecto a aquellas correspondientes a la β -Lactoglobulina y se pueda sustituir por β -Lactoglobulina glicosilada el suero lácteo agregado a productos alimentarios como agente espumante y/o emulsionante.

La reacción de glicosilación de β -lactoglobulina ha sido estudiada previamente utilizando carbohidratos de diferente naturaleza. Este trabajo pretende diferenciarse de los anteriores evaluando en forma sistemática la influencia del grado de sustitución y del aumento del tamaño molecular del carbohidrato en la glicosilación sobre las propiedades funcionales de la β -lactoglobulina. En tal sentido se hizo uso de tres carbohidratos glucosa, lactosa y dextrano de bajo peso molecular (PM 1500 Da) y se analizaron las propiedades emulsionantes y espumantes de los compuestos glicosilados comparativamente con los de la proteína sin glicosilar. Hasta donde hemos podido indagar no existen antecedentes previos sobre el efecto de la reacción de glicosilación sobre las propiedades funcionales de la β -lactoglobulina dependientes de sus características superficiales.

Por otra lado el empleo de nuevas y mejores formas de análisis y evaluación de resultados aportados por nuevos equipos, permitirán obtener nuevos conocimientos que aporten al conocimiento de las propiedades funcionales de proteínas sustituidas con carbohidratos.

Es de esperar que la modificación de las proteínas por glicosilación, con diferentes carbohidratos, monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos, provoque un aumento del tamaño, de la carga negativa neta y de la

hidrofilicidad de la molécula proteica. Estos cambios estructurales se supone que se han de reflejar en una mayor interacción proteína - agua lo que ha de conducir a un aumento de la solubilidad en este medio y del volumen hidrodinámico de la molécula provocando una mayor viscosidad. Entre las propiedades funcionales que se han de ver afectadas por la glicosilación se encuentran aquellas relacionadas con las propiedades de superficie de las proteínas. Las modificaciones estructurales promovidas por la glicosilación inducirán una diferente conformación de la proteína en la interface, lo que habría de favorecer la formación de espumas y emulsiones así como probablemente su estabilidad. En el caso de espumas una máxima interacción proteína - proteína ha de aumentar la estabilidad mientras que en las emulsiones el agregado de carbohidratos ha de favorecer la repulsión estérica entre las gotas. Por otra parte, en ambos casos la estabilidad ha de estar directamente relacionada con el aumento de viscosidad de la fase continúa.

OBJETIVO

Objetivo general y específicos.

Objetivo General

- ◆ Modificar la β -Lactoglobulina por glicosilación mediante reacción de Maillard, a efectos de obtener productos y/o ingredientes alimentarios con mejores propiedades funcionales.

Objetivos Específicos

- ◆ Seleccionar las condiciones óptimas de reacción que conduzcan a un grado de glicosilación determinado.
- ◆ Elucidar los cambios conformacionales sufridos por la β -Lactoglobulina como consecuencia de la glicosilación.
- ◆ Estudiar las propiedades funcionales dependientes de las características de superficie de las proteínas modificadas.
- ◆ Relacionar el grado de glicosilación alcanzado con los cambios estructurales y las propiedades funcionales exhibidos por las proteínas modificadas.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- Materiales y reactivos

El aislado de β -Lactoglobulina (Biopure-betalactoglobulin™) fue cedido por la empresa Davigo Food International (Le Sueur, MN, USA). El contenido de β -Lactoglobulina fue de 90% p/p (determinado por HPLC)

El dextrano utilizado (Dextran T1.5) fue cedido por PHARMACOSMOS A/S (HOLBAEK, DENMARK). Siendo el PM medio del dextrano 1500 g/gmol

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico, glucosa y lactosa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.2.- Preparación de las muestras glicosiladas de β -Lactoglobulina

2.2.1. Glicosilación no enzimática de proteínas

Las diferentes muestras de β -Lactoglobulina glicosiladas se prepararon siguiendo el siguiente procedimiento experimental. La β -Lactoglobulina se dispersó en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0, con una concentración de azúcar de 9,1 mM y de la proteína de 0,91mM y 0,091mM según correspondiera a una relación molar de 1/10 o 1/100. Las dispersiones fueron agitadas, con agitador magnético, durante 1 hora a temperatura ambiente. La dispersión obtenida se liofilizó y se colocó en cámaras de actividad de agua (aw) 0,65, utilizando solución saturada de Ioduro de potasio para saturar la atmósfera, las cuales se colocaron en estufa a 50°C para que se de la reacción de glicosilación por un periodo de 51 y 96 horas. Una vez transcurrido el tiempo de reacción las muestras fueron dializadas contra agua destilada conteniendo carbonato de amonio 20 mM a 5° C con agitación continua durante 48 horas, para remover el carbohidrato que no reacciona. Se utilizó para ello una membrana de diálisis permeable a moléculas con una masa molecular: inferior a 8-10 kDa. Las muestras de β -Lactoglobulina glicosiladas fueron finalmente obtenidas por liofilización de las soluciones resultantes.

Los blancos de reacción se prepararon con muestras de β -Lactoglobulina, sin agregado de carbohidratos, sometidas al mismo tratamiento descrito previamente. Los blancos fueron diseñados de manera tal que permitieran diferenciar el efecto del tratamiento térmico del de glicosilación.

El ensayo de preparación de compuestos glicosilados de β -Lactoglobulina con glucosa, lactosa y dextrano 1.5 se realizó por triplicado.

La nomenclatura de las distintas muestras glicosiladas y de los blancos correspondientes empleada a lo largo del presente trabajo se detalla en la Tabla adjunta:

Tabla 2.1 Nomenclatura utilizada para las distintas muestras

<i>Nomenclatura</i>	<i>Muestra</i>
Lg s tt	β -Lactoglobulina sin modificar
Lg c tt 51h	β -Lactoglobulina con tratamiento térmico de 51 horas
Lg c tt 96h	β -Lactoglobulina con tratamiento térmico de 96 horas
10 51 G	β -Lactoglobulina con glucosa relación molar 1:10 tiempo de reacción 51 horas
10 96 G	β -Lactoglobulina con glucosa relación molar 1:10 tiempo de reacción 96 horas
100 51 G	β -Lactoglobulina con glucosa relación molar 1:100 tiempo de reacción 51 horas
100 96 G	β -Lactoglobulina con glucosa relación molar 1:100 tiempo de reacción 96 horas
10 51 L	β -Lactoglobulina con lactosa relación molar 1:10 tiempo de reacción 51 horas
10 96 L	β -Lactoglobulina con lactosa relación molar 1:10 tiempo de reacción 96 horas
100 51 L	β -Lactoglobulina con lactosa relación molar 1:100 tiempo de reacción 51 horas
100 96 L	β -Lactoglobulina con lactosa relación molar 1:100 tiempo de reacción 96 horas
10 51 D	β -Lactoglobulina con dextrano relación molar 1:10 tiempo de reacción 51 horas
10 96 D	β -Lactoglobulina con dextrano relación molar 1:10 tiempo de reacción 96 horas
100 51 D	β -Lactoglobulina con dextrano relación molar 1:100 tiempo de reacción 51 horas
100 96 D	β -Lactoglobulina con dextrano relación molar 1:100 tiempo de reacción 96 horas

2.3.- Caracterización fisicoquímica-estructural de los compuestos obtenidos

Las dispersiones de β -Lactoglobulina glicosilada con los distintos carbohidratos y los blancos, a ser utilizadas en los ensayos de caracterización, se prepararon a una concentración de 1mg/mL en buffer fosfato 100mM pH 7,5. En todos los casos las distintas muestras fueron agitadas, haciendo uso de agitadores magnéticos, durante 1 hora a temperatura ambiente.

2.3.1. Contenido de proteína

El contenido de proteína de todas las muestras se determinó por el método de Lowry (Lowry y col., 1951) y por el método de Kjeldahl (AOAC, 1995), utilizando como factor de conversión de Nitrogeno a proteína 6,38. Para las determinaciones se utilizaron dispersiones conteniendo 100 μ g de muestra por mL de una solución de fosfato de sodio 0,01 M, pH 7,5. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.3.2.- Solubilidad proteica

Para determinar la solubilidad las diferentes muestras fueron dispersadas en solución de fosfato de sodio 100 mM pH 7,5 al 1 % p/v durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 10.000 xg durante 10 minutos a 4 °C. El contenido de proteína en el sobrenadante se determinó utilizando el método de Lowry (Lowry y col., 1951). La solubilidad se expresó como Índice de solubilidad (IS) según la ecuación 2.1

$$IS = \left(\frac{\text{Proteína soluble (g)}}{\text{Proteína Total (g)}} \right) \times 100 \quad (2.1)$$

Las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.3.3. Electroforesis

Las corridas electroforéticas se realizaron en un equipo BIO-RAD MINI PROTEIN II CELL. Para la separación de proteínas se utilizaron geles de poliacrilamida con Tricina - Dodecil Sulfato de Sodio (Tricine-SDS-PAGE) según la técnica descrita por Schagger y Von Jagow (1987).

Los geles apilador, espaciador y separador fueron preparados con 4%, 10% y 16,5% de acrilamida respectivamente. Las muestras fueron dispersadas en buffer conteniendo 4% SDS, 12 % glicerol (w/v), 50 mM Tris, 2% mercaptoetanol (v/v) y 0.01% Serva Blue ajustando el pH a 6,8 por el agregado de HCl (0,1M).

La solución buffer catódica utilizada fue Tris 0,1 M, tricina 0,1 M, SDS 0,1 % (p/v) y la anódica Tris-HCl 0,2 M, pH 8.9. La corrida fue realizada a 30 V, 30 mA hasta que el frente pasa el gel apilados y desde ahí en adelante a un voltaje constante de 90 V para dos geles de 1,5 mm de espesor. Se utilizó una unidad de electroforesis SE 640 Hoefer Scientific Instruments.

Los geles fueron fijados con una solución de agua: metanol: ácido acético (4:5:1) durante 30 minutos y coloreados por tratamiento con solución

0,1 % de Coomasie Blue R-250 en agua: metanol: ácido acético (6:3:1) durante 12 horas a temperatura ambiente. Los geles fueron decolorados con solución decolorante de agua:metanol:ácido acético (6,5:2,5:1).

El peso molecular de las proteínas fue estimado mediante el uso de un patrón de pesos moleculares (Biorad SDS-calibration kit) constituido por Triosa-fosfato isomerasa (26,625 kDa), Mioglobina (16,950 kDa), Lactoalbumina (14,437kDa), Aprotinina (6,512 kDa), Insulina b (3,496 kDa) y Bacitracina (1,423 kDa).

2.3.4.- Hidrofobicidad aromática superficial

Los valores de hidrofobicidad aromática superficial (H_o) de cada muestra fueron determinados por unión de la sonda fluorescente ANS (ácido 1-anilino 8 naftalen-sulfónico) a los restos hidrofóbicos de las proteínas de acuerdo al método de Hayakawa y Nakai (1985). Las dispersiones proteicas (1 mg/mL) fueron preparadas en buffer fosfato de sodio 100 mM pH 7,5 agitadas durante 60 minutos a temperatura ambiente en forma constante. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 10.000 xg durante 10 minutos a 4 °C. La concentración de proteína en el sobrenadante se determinó por el método de Lowry (Lowry y col., 1951)

El sobrenadante fue serialmente diluido con el mismo buffer, hasta obtener concentraciones de proteína en el rango de 1 a 0,05 mg/mL. A 1 mL de cada dilución se agregó 15 μ L de ANS (8,0 mM en buffer fosfato de sodio 100 mM, pH 7,5). La intensidad de fluorescencia se midió a una longitud de onda de emisión de 475 nm y una de excitación de 363 nm en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer 2000. La intensidad de fluorescencia relativa se ajustó a un 80% de la escala usando 5 μ l de ANS 8 mM en 1 mL de metanol absoluto. Según Kato y Nakai (1980) el índice de hidrofobicidad superficial (H_o) corresponde a la pendiente inicial de la curva de intensidad de fluorescencia relativa versus la concentración de proteína. La fluorescencia relativa se determinó como el cociente entre la intensidad de fluorescencia neta (IFN) y la intensidad de fluorescencia máxima, leída para el ANS en metanol (IFANSm). La IFN se determinó restando a la intensidad de fluorescencia emitida por el conjugado proteína-ANS (IFe) la intensidad de fluorescencia del blanco (IFb):

$$IFN = IFe - IFb \quad (2.2)$$

$$IF = \left(\frac{IFN}{IFANSm} \right) \quad (2.3)$$

2.3.5.- Fluorescencia en el UV

Los espectros de fluorescencia en el UV se realizaron para determinar los cambios sufridos por los grupos tyr (303), trp (348) y phe (282) expuestos. Para ello se utilizó un espectrofluorómetro Perkin-Elmer 2000. El barrido de emisión fue registrado entre 310 y 560 nm de longitud de onda, usando como longitud de onda de excitación 295 nm.

La intensidad máxima de fluorescencia y la longitud de onda de emisión de las muestras fueron determinadas usando triptófano como estándar.

Las muestras a analizar (0,03 mg/mL) fueron dispersadas en buffer fosfato de sodio 100 mM pH 7,5. Luego fueron centrifugadas a 10.000 xg durante 10 minutos a 4 °C, realizando la determinación por triplicado. El contenido de proteína se determinó por el método de Lowry (Lowry y col., 1951).

2.3.6. Estabilidad térmica y grado de conformación nativa determinado por calorimetría diferencial de barrido (DSC):

El comportamiento térmico de la β -Lactoglobulina sin glicosilar y glicosilada se estudió por calorimetría haciendo uso de un calorímetro diferencial de barrido Polymer Laboratories PL – DSC, (Rheometric Scientific DSC 2, Ltd., Epsom, England) que emplea un Software Plus V5.41 y de un segundo calorímetro DSC Serie Q100 TA Instruments que utiliza un software Universal Analysis 2000. Para la calibración del equipo se utilizaron indio, ácido láurico y ácido esteárico (pa) como estándares.

Todas las muestras fueron analizadas al menos por duplicado. Para realizar el ensayo se prepararon dispersiones al 20% de proteína en agua destilada. Se utilizaron cápsulas de aluminio herméticas en las que se colocaron aproximadamente 20 mg de muestra. Como referencia se utilizó una

cápsula con muestra, previamente sometida al ensayo térmico. Las condiciones de ensayo utilizadas fueron: velocidad de calentamiento, 10 °C/min, en un intervalo de temperatura entre 25 y 120 °C. Una vez realizado el ensayo de DSC se determinó el contenido de materia seca de las muestras en estufa por calentamiento a 105 °C, con perforación previa de las cápsulas, hasta peso constante.

Los parámetros calorimétricos estudiados fueron: la temperatura de inicio del pico de desnaturalización (T_0), la cual fue determinada por la intersección de la tangente del pico con la línea de base de la curva de calentamiento. La desnaturalización aparente fue determinada por la temperatura de máxima deflexión (T_d) y la entalpia de desnaturalización (ΔH), calculada por medida del área bajo el pico limitada por la línea de base.

2.4 - Determinación del avance de la reacción de glicosilación

2.4.1.- Espectrometría de masa MALDI-TOF

MALDI-TOF es una técnica de ionización suave utilizada en [espectrometría de masas](#). Se denomina MALDI por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (desorción/ionización láser asistida por matriz) y TOF por el detector de iones que se acopla al MALDI y cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés Time-Of-Flight (tiempo de vuelo).

En la ionización por MALDI la muestra se mezcla con la matriz en exceso sobre una superficie de metal de tal forma que ambas cocrystalizan cuando se evapora el solvente. Esta preparación es sometida a pulsos cortos de láser en alto vacío lo que provoca una absorción de energía por parte de la matriz la cual es convertida en energía de excitación y en transferencia de H^+ a la muestra (ionización) dando lugar, normalmente, a especies monocargadas. El área irradiada, de unas pocas micras, se calienta dando lugar a la desorción de los iones de fase sólida a fase gaseosa.

El TOF es el analizador que más comúnmente se asocia con experimentos de MALDI. La determinación de la masa en una región de alto

vacío se realiza mediante una medida muy precisa del período de tiempo desde la aceleración de los iones en la fuente (source) hasta que estos impactan con el detector

El hecho de que la ionización por MALDI permita detectar moléculas termolábiles como son las proteínas de forma intacta, la incluye dentro de los métodos de ionización suave (“soft-ionization”). No obstante, durante el proceso de aceleración ó durante el “vuelo” a través del tubo, se produce una descomposición metastable denominada PSD (“Post Source Decay”). El análisis de los iones que se producen mediante este fenómeno proporciona información estructural de la molécula original muy útil, para lo cuál es necesario separar estos fragmentos. En un analizador de tipo linear esto no es posible ya que los iones formados por PSD tienen la misma velocidad que el ion original y viajan juntos hasta el detector; para separarlos se emplean analizadores de tipo reflector que trabajan con voltajes variables para finalmente obtener un único espectro de fragmentación-PSD compuesto de tantos espectros como voltajes empleados que se unen con ayuda informática.

Los espectros de masas MALDI-TOF de la β -Lactoglobulina glicosiladas con los distintos carbohidratos y la β -Lactoglobulina sin glicosilar fueron obtenidos en un espectrómetro Voyager DE-PRO MALDI-TOF-MS (Perspective/ Applied Biosystems, EUA), equipado con un láser de Nitrogeno a una longitud de onda de 337 nm con una duración de pulso τ (tau)= 10 ns y un reflector.

Las muestras fueron diluidas en solución saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en 0,1% TFA con 33% de acetonitrilo. Una alícuota de esta preparación se depositó en la platina de acero inoxidable y se secó al aire. Las placas con las muestras preparadas fueron usadas para el análisis. Para cada muestra se promediaron los resultados obtenidos en 3 puntos individuales de la placa y sobre cada uno de estos se realizaron 100 disparos del laser. Se estudiaron los espectros de masa en la modalidad de reflectron aplicada para enfocar las partículas en vuelo hacia el detector. El potencial del campo de extracción continua fue de 19 kV.

El rango de monitoreo fue m/z 10000-40000

La calibración externa fue realizada utilizando como estándar una mezcla de péptido/proteína.

2.4.2. Furosina

La furosina, compuesto estable de la reacción de Maillard, es generado por la hidrólisis ácida del producto de Amadori (lactulosil-lisina o fructosil-lisina). Este compuesto se determinó siguiendo el método descrito por (Resmini y col., 1990). Una muestra de los productos glicosilados y sus blancos respectivos conteniendo 20 mg de proteína fueron hidrolizados con 3 mL de HCl 6M durante 24 horas a una temperatura de 110°C. Seguidamente el hidrolizado fue disuelto en 2 mL de HCl 8 N y se filtró utilizando papel Whatman N°. 40. El solvente fue eliminado por evaporación y el sólido remanente fue disuelto en 500 µL de agua, los cuales se inyectaron en la columna de extracción Sep-Pack C18 (SPE) (Millipore Corporate Headquarters, Billerica, Massachusetts, USA), previamente activada.

La furosina fue eluida con 3 mL de HCl 3 N, se evaporó el solvente y el residuo se disolvió en 3 mL de la fase móvil que se emplea en la determinación del compuesto por HPLC.

La cuantificación de furosina se realizó por Cromatografía líquida de alta presión, utilizando un detector UV con arreglo de diodos (Shimadzu modelo LC-10AT) y una columna Spherisorb ODS(2) ((250 X 4,6) mm X 5µm)Phenomenex , USA. Las condiciones de operación fueron las siguientes: Temperatura ambiente; fase móvil de corrida: Heptanesulfonato de sodio 5mM en 20% de acetonitrilo y 0,2% de ácido fórmico. La elución fue isocrática y el flujo 1,2 mL/min; el volumen de inyección fue de 20 µL. La detección se realizó a 280 nm. (Delgado y col. 1992).

La calibración fue realizada usando soluciones de concentración conocida de furosina estándar comercial (NeoMPS Laboratories, Strasbourg, France) entre (0 y 0.8 mg/L).

2.4.3. Color

Para la determinación del color de las muestras en estudio se utilizó un colorímetro triestímulo (Chromater CR-300 series, data processor DP-30, Minolta Co. Ltda, Japón). Se obtuvo el espacio de color Hunter L, a y b, que es un espacio de color rectangular de 3 dimensiones basada en la teoría de los colores opuestos (Hunter 1958). El eje L (luminosidad) varía de 0 (negro) a 100 (blanco), el eje a (eje de rojo a verde) presenta valores positivos

correspondientes a los rojos y negativos correspondientes a los verdes siendo el 0 neutro y el eje b (eje de azul a amarillo) presenta valores positivos para el amarillo y negativos para el azul siendo el 0 neutro Figura 2.2.

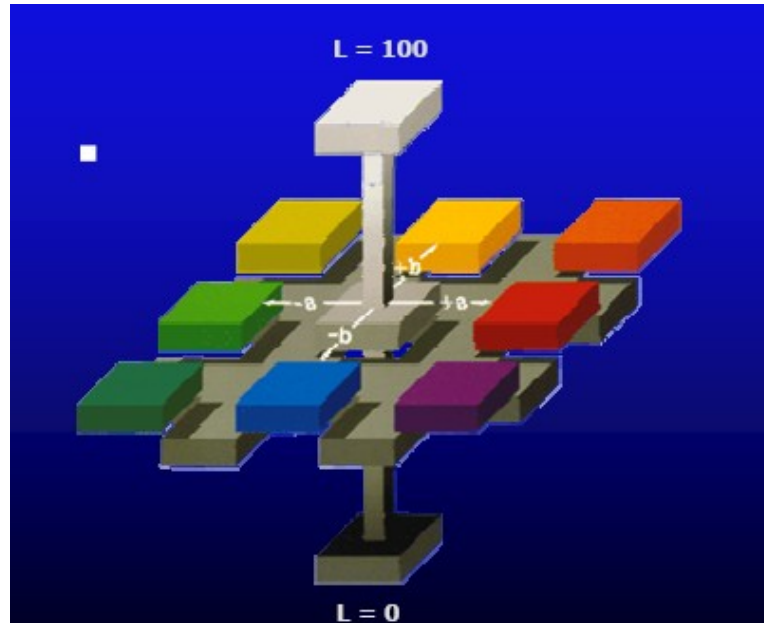


Figura 2.2: Espacio de color Hunter L, a y b. (www.hunterlab.com)

Si se convierten los valores (a^* y b^*) en coordenadas polares, se obtienen los valores (C^* y H^*) que miden los atributos perceptuales de matiz o tono (*hue*- H^*) y croma (*chroma*- C^*). El tono se obtuvo según la ecuación 2.6 o 2.7 en tanto el croma se obtuvo según la ecuación 2.8

$$H^* = \operatorname{tg}\left(\frac{b}{a}\right) \quad \text{si } a \geq 0 \quad (2.6)$$

$$H^* = 180 - \operatorname{tg}\left(\frac{b}{a}\right) \quad \text{si } a \leq 0 \text{ y } b \geq 0 \quad (2.7)$$

$$C^* = \sqrt{(a^2 + b^2)} \quad (2.8)$$

2.5 - Determinación de propiedades funcionales

2.5.1. Tensión superficial e interfacial

2.5.1.1.- Constantes de absorción y reordenamiento de proteína en la interfase y tensión de equilibrio

Para seguir el proceso de modificación de la tensión superficial en el tiempo y dado que los procesos de adsorción, desenrollamiento y reordenamiento de la molécula de proteína en la interfase ocurren en forma simultánea, se utilizó como modelo cinético una ecuación de primer orden con dos componentes exponenciales según lo propuesto por Panizzolo (2005)

$$\gamma_t = \gamma_a e^{-k_a t} + \gamma_r e^{-k_r t} + \gamma_e \quad (2.9)$$

donde k_a y k_r son constantes de velocidad de primer orden para los procesos de adsorción y reordenamiento de las proteínas en la interfase aire-agua respectivamente, γ_a , γ_r y γ_e : son los parámetros de amplitud de la tensión superficial en los distintos estados conformacionales de adsorción, reordenamiento y equilibrio de la proteína en la interfase.

Estos parámetros se estimaron mediante regresión de cuadrados mínimos. Las determinaciones corresponden a réplicas por triplicado que a su vez se ensayaron por lo menos tres veces.

2.5.1.2.- Parámetros viscoelásticos.

Los parámetros viscoelásticos, módulo dilatacional superficial, E , y sus componentes elástica, ϵ_d , y viscosa, η_d , se midieron en función del tiempo (θ), manteniendo constante la amplitud de la deformación ($\Delta A/A$) y la frecuencia de la oscilación (ω).

En el método empleado la gota se somete a una compresión-expansión sinusoidal controlada automáticamente, a la frecuencia y amplitud deseadas. El módulo dilatacional superficial se determina a través del cambio de tensión interfacial, γ , (ecuación 2.10), que resulta de un pequeño cambio de la superficie de la gota, A , (ecuación 2.11), según la ecuación 2.12 (Lucassen-Reynders, 1993).

$$\gamma = \gamma_0 \times \text{sen}(\omega \theta + \phi) \quad (2.10)$$

$$A = A_0 \times \text{sen}(\omega \theta) \quad (2.11)$$

$$E = \frac{d\gamma}{dA} = \frac{d\pi}{d \ln A} \quad (2.12)$$

donde γ_0 y A_0 son las amplitudes del esfuerzo y de la deformación, respectivamente,

Φ : es el ángulo de fase entre el esfuerzo y la deformación, $\Pi = \gamma_0 - \gamma$: es la presión superficial, y γ_0 : es la tensión interfacial en ausencia de proteína.

El módulo dilatacional superficial es una cantidad compleja que se compone de una parte real y otra imaginaria (ecuación 2.13). La parte real del módulo, o componente de almacenamiento, es la elasticidad dilatacional superficial, $\epsilon d = |E| \cos \Phi$. La parte imaginaria del módulo, o componente de pérdida, es la viscosidad dilatacional superficial, $\eta d = |E| \text{sen} \Phi$.

La relación (γ_0/A_0) es el valor absoluto del módulo $|E|$, una medida de la resistencia del material a una deformación dilatacional (elástica + viscosa).

Para un material perfectamente elástico el esfuerzo y la deformación están en fase ($\Phi = 0$) y el término imaginario del módulo es cero. En el caso de un material perfectamente viscoso, Φ es igual a 90 y la parte real del módulo es cero. La tangente del ángulo de pérdida se define mediante la ecuación (2.14). Si la película es puramente elástica, la tangente del ángulo de pérdida es cero.

$$E = \left(\frac{\gamma_0}{A_0} \right) \times (\cos \phi + i \text{sen} \phi) = \epsilon d + i \eta d \quad (2.13)$$

$$\tan \phi = \frac{\eta d}{\epsilon d} \quad (2.14)$$

El valor de densidad del aceite utilizado se llevó a cabo mediante determinaciones picnométricas a $20^\circ \text{ C} \pm 2^\circ$. La densidad del aceite (δ_a), se calculó a partir de la siguiente expresión

$$\delta_a = \left(\frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \right) \cdot \delta_{\text{agua}} \quad (2.15)$$

donde m_1 : masa del picnómetro vacío (en gramos), m_2 : masa del picnómetro lleno de agua (en gramos), m^3 : masa del picnómetro lleno de aceite, (en gramos), δ_{agua} = densidad del agua a 20° C

2.5.1.3 Tensión superficial e interfacial con tensiómetro dinámico

Las mediciones de tensión superficial (agua/aire) e interfacial (agua/aceite) de equilibrio y las propiedades reológicas superficiales de las películas adsorbidas sobre la interfase (agua/aceite) y (agua/aire) de todas las muestras dispersadas en una concentración de 1 mg/mL en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,5, se llevaron a cabo en un tensiómetro dinámico de gota (Tracker, IT-Concept, Saint-Clementtes Places, France). Las experiencias se realizaron a temperatura ambiente. La disolución de proteína se colocó en la cubeta del tensiómetro, y el aire o el aceite en la jeringa desde la que se forma la gota. Una vez formada la gota se evaluaron los cambios de tensión interfacial o superficial y las características viscoelásticas de la película en función del tiempo. Cada medición se realizó al menos por triplicado.

Las determinaciones se realizaron, durante 3600 s, sin someter a la gota a ningún tipo de variación, sobre las dispersiones acuosas diluídas de las muestras (1 mg/mL) que fueron empleadas para preparar las emulsiones y estudiar su estabilidad.

2.5.1.4.- Descripción del tensiómetro dinámico

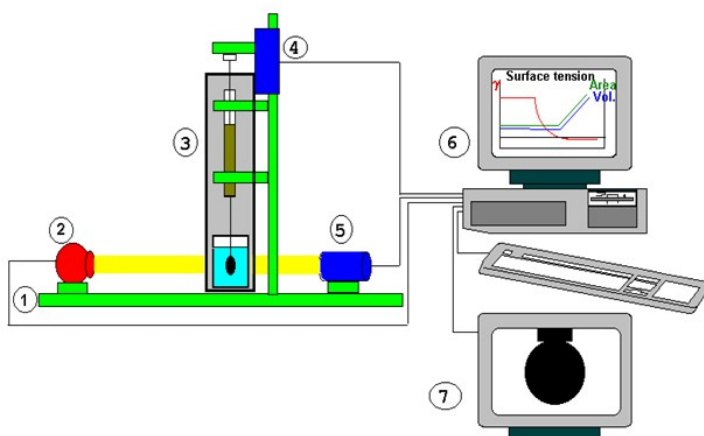


Figura 2.3 Representación esquemática y fotografía del tensiómetro dinámico de gota (Tracker). 1: base de fibra óptica 2: Fuente luminosa 3: jeringa 4: Motor 5: Cámara 6: Computadora 7: monitor de video. (Tomado de Alain CAGNA, IT-Concept, Saint-Clementtes Places, France, 2008)

El diseño esquemático del equipo Tracker y su fotografía se muestran en la Figura 2.3. En el extremo de la aguja se forma una gota mediante el movimiento del émbolo de la jeringa (3) controlado por un motor (4). El proceso de formación de la gota y sus variaciones en la tensión superficial, es seguido al ser enfocada la gota por una fuente luminosa (2) sobre una cámara (5). El proceso se visualiza en el monitor de video (7) y se registra la información recolectada en la computadora (6), la que mediante su software permite seleccionar las distintas condiciones de medida y realizar el análisis de los datos recolectados. En la operación el software captura una imagen de la gota y le asigna valores según el protocolo de análisis elegido por el usuario, los compara con valores teóricos obtenidos según ecuación 2.16, 2.17 y 2.18 utilizando valores estimados de ω y γ , luego se van ajustando estos parámetros por sucesivas estimaciones entre los valores teóricos y experimentales.

2.5.1.4.1.- Determinación de la tensión utilizando tensiómetro dinámico

¿Como se determina la tensión superficial de la gota utilizando el tracker?

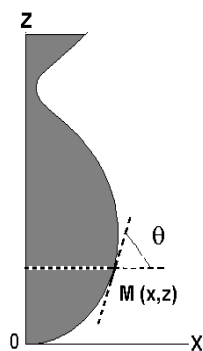


Figura 2.4. Perfil de la gota formada

El software del Tracker utiliza dos ecuaciones para obtener la tensión interfacial:

- 1) Ecuación de Laplace -Young

$$\Delta P = \gamma \left(\frac{1}{R} + \frac{1}{R'} \right) \quad (2.16)$$

donde ΔP : es la diferencia de presión dentro y fuera de la gota en un punto M de la interfase Ver figura 2.4, γ : es la tensión interfacial, R y R' son los radios de curvatura en el punto M de la interfase. Siendo R y R' ortogonales.

2) Ecuación de equilibrio hidrostático en un plano que pasa por el punto M

$$2\pi x \gamma \sin \theta = V(\rho_h + \rho_l)g + \pi x^2 \Delta P \quad (2.17)$$

donde ΔP : es la diferencia de presión entre el interior y el exterior de la gota en el punto M en la interfaz, g: es la aceleración de la gravedad, γ : es la tensión interfacial, V: es el volumen por debajo de un plano que pasa por el punto M, ρ_h y ρ_l son densidades de las fases

Ecuación de la gota en el punto M

No es posible sustituir simplemente la expresión de ΔP de Young-Laplace en la ecuación 2.17, ya que la primera ecuación se encuentra en coordenadas de superficie y la ecuación 2.17 en coordenadas cartesianas. Ambas ecuaciones deben expresarse en el mismo sistema de coordenadas con el fin de combinarlas y obtener una solución para la tensión superficial (γ). Dicha solución se obtiene por sucesivas aproximaciones.

La ecuación se puede simplificar de manera que la forma sólo dependa de un parámetro número de enlace (ω)

donde $\Delta\rho$: es la diferencia de densidad entre las dos fases.,g: es la aceleración

$$\omega = \frac{g\Delta\rho}{\gamma b^2} \quad (2.18)$$

de la gravedad; b: es $1/r$, donde r es el radio de caída en su ápice. Se debe tener en cuenta que los radios de curvatura en el vértice de caída son iguales, $R=R'$

2.5.1.5.- Tensión superficial con tensiómetro de volumen de gota

Las determinaciones de tensión superficial (γ) en la interfase agua-aire se llevaron a cabo con un tensiómetro de volumen de gota Lauda TVT2 (Lauda Dr. R. Wobser GMBH & CO. KG Lauda-Königshofen Germany) con jeringa de inyección de 2,5 mL. Las condiciones del ensayo fueron las siguientes: la corrida se inició con un intervalo de velocidad de formación de gota 0,07-0,10 s/ μ L, número de ciclos de mediciones y número de gotas por ciclo de medición: 6x3 bajo el método dinámico con retención de gota, se continuó con un intervalo de velocidad de formación de gota 0,10-0,80 s/ μ L, número de ciclos de mediciones y número de gotas por ciclo de medición: 9x3, método dinámico con retención de gota y se finalizó con una medida en modo cuasiestático sin retención de gota en las condiciones $dV_1 = 10.0\%$ y $dV_x = 1.0\%$, tiempo máximo de medida 600 s, número de ciclos de mediciones y número de gotas por ciclo de medición: 9x3. El ensayo se realizó sobre disoluciones de las muestras a concentración de 1mg/mL a pH 7,5, en buffer fosfato 10 mM.

Para seguir el proceso de modificación de la tensión superficial en el tiempo, se utilizó nuevamente la ecuación 2.9. Los parámetros se determinaron mediante regresión de cuadrados mínimos.

2.5.1.5.1 Descripción del tensiómetro de volumen de gota

El principio del método de volumen de gota se basa en medir el volumen o peso de una gota que cae desde un capilar de sección circular. La tensión interfacial se calcula a partir del volumen de la gota (V) y el diámetro del capilar ($2r$) ([Miller y col., 1992](#)).

El diseño esquemático del equipo Lauda TVT 2 se muestra en la Figura 2.4. En el extremo del capilar (1) se forma una gota mediante el movimiento del émbolo de la jeringa (3) controlado por un motor-codificador (2). El proceso de formación de la gota, se controla mediante un microprocesador (4). El momento de desprendimiento de la gota del capilar se registra mediante un sensor óptico (5) ubicado por debajo del extremo del capilar. El control del sistema mediante una computadora (PC) permite elegir la velocidad de formación de gota, el procedimiento de medición y la transferencia de datos

para su posterior interpretación. Las gotas son recolectadas en una cubeta (7), la cual puede ser termostatzada.

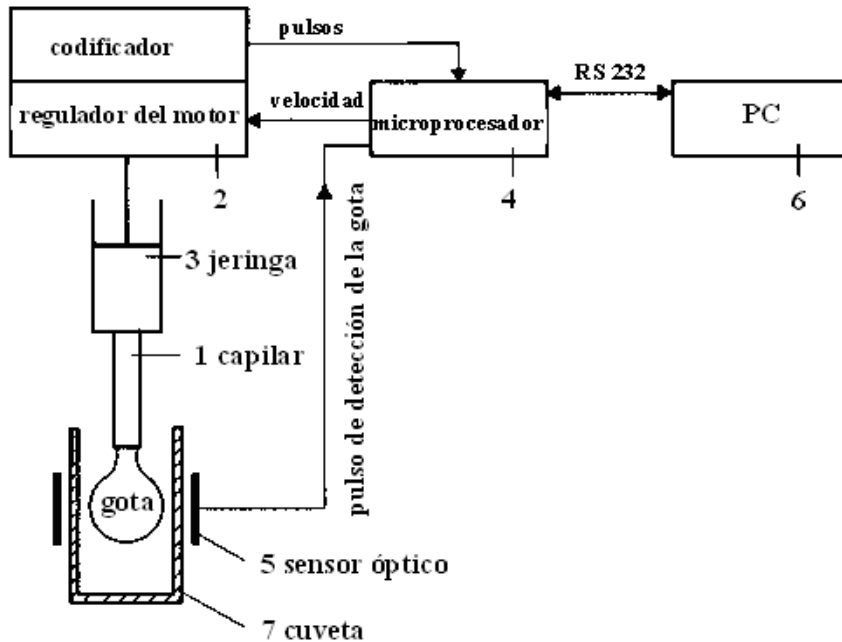


Figura 2.5 Representación esquemática y simplificada del tensiómetro de volumen de gota Lauda TVT 2. (Tomado de [Miller y col., 1992](#)).

Cuando la gota crece el peso de la misma (F_G) se incrementa (Figura 2.5a) hasta que compensa exactamente a la fuerza que mantiene unida la gota al capilar (F_σ) (Figura 2.5b). En ese momento la gota cae (Figura 2.5c) y es registrada por un sensor óptico, el cual transfiere los datos a la unidad de control y a la PC. Multiplicando la distancia recorrida por el émbolo (ΔL) por el área transversal (A) de la jeringa se obtiene el volumen de la gota (Figura 2.6).

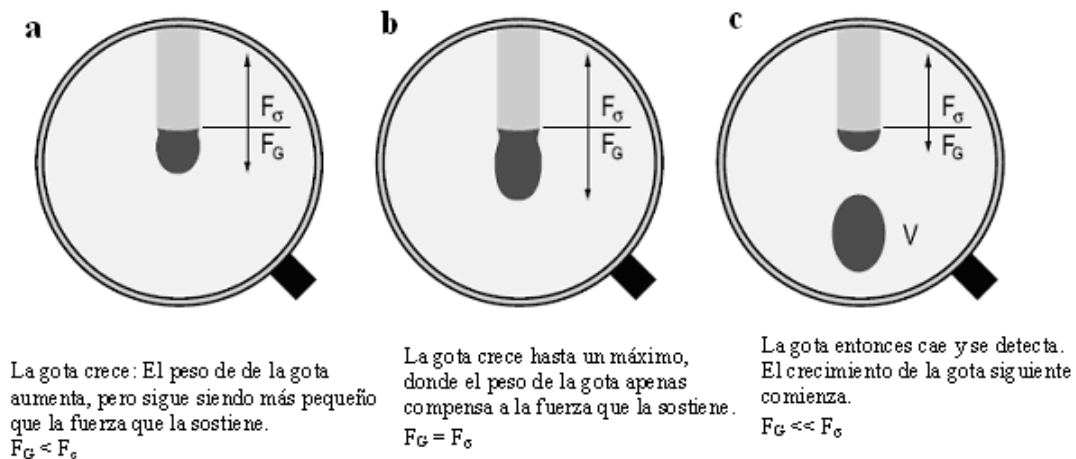


Figura 2.5. Representación esquemática de la formación de gota. F_G peso de la gota, F_0 fuerza que mantiene unida (sostiene) la gota al capilar. (Tomado de www.lauda.de).

2.5.1.5.2. Determinación de la tensión utilizando tensiómetro de volumen de gota

La tensión superficial se calcula a partir del volumen de gota mediante la siguiente expresión (ecuación de Gauss-Laplace):

$$\gamma = \left[\frac{(\Delta \delta g V)}{2\pi r f} \right] \quad (2.19)$$

$$f\left(\frac{r}{a}\right) \quad (2.201)$$

$$a = \sqrt{\left(\frac{2\gamma}{\Delta \delta g}\right)} \quad (2.21)$$

donde $\Delta\rho$: es la diferencia de densidad entre las dos fases, g : es la aceleración de la gravedad, V : es el volumen de la gota, $2r$: es el diámetro externo del capilar y por tanto $2\pi r$ es la circunferencia del capilar en la cual actúa la tensión superficial.

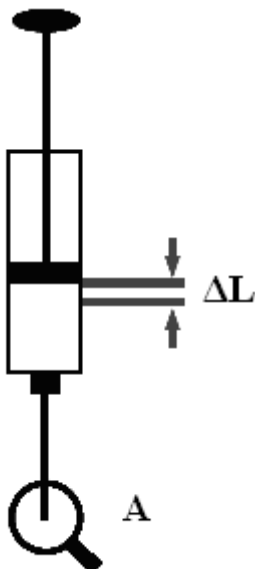


Figura 2.6. Multiplicando la distancia recorrida por el émbolo (ΔL) por el área transversal (A) de la jeringa se obtiene el volumen de la gota. (Tomado de www.lauda.de).

Cuando la gota se desprende (Figura 2.7) no lo hace directamente en el borde del capilar por lo que es necesaria la corrección del término $2\pi r$ en la ecuación de Laplace. Ello se logra mediante la función $f(r/a)$ que es la función de corrección que relaciona la tensión interfacial con el volumen de la gota desprendida y ha sido determinada con capilares de distintos radios y distintos líquidos puros ([Miller y col., 1992](#)).

Los métodos de medición principales son dos. En el método dinámico o clásico se genera un flujo continuo de líquido por el movimiento del pistón de la jeringa a una velocidad constante. Después de que la gota alcanza su peso o volumen crítico, la gota cae y se vuelve a formar una nueva gota. La velocidad de formación de la gota permite el control de la formación de gotas en un intervalo de 0,3 segundos a 30 minutos por gota. Como resultado, se obtiene la tensión interfacial en función del tiempo de formación de las gotas. Para sistemas que contienen sustancias activas superficialmente, el tiempo de formación de la gota es diferente de la edad efectiva de la interfase ([Miller y col., 1992](#)).

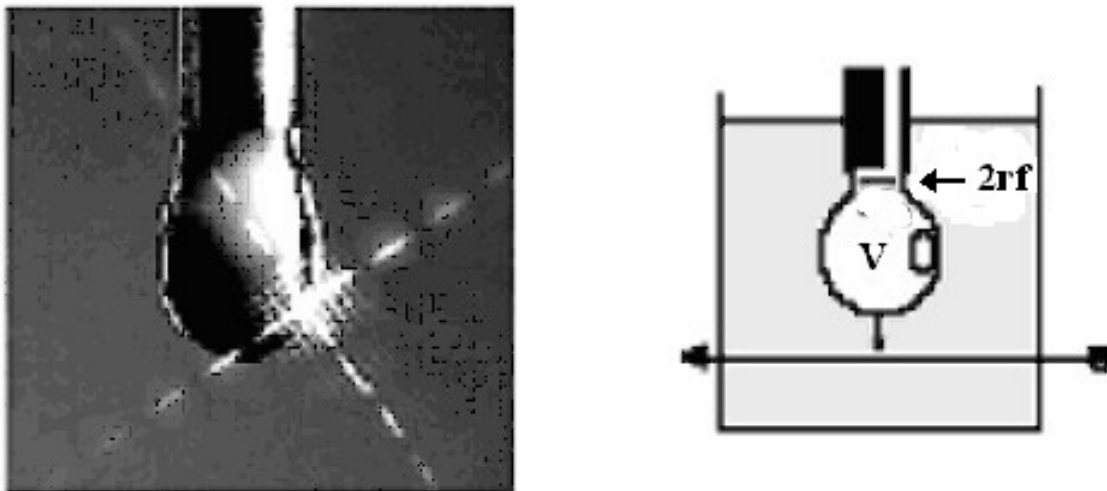


Figura 2.7: Representación esquemática del desprendimiento de la gota. El estrechamiento de la gota por debajo del borde del capilar, hace necesario la aplicación de un factor de corrección en la ecuación de Laplace. V: volumen de la gota, r: radio del capilar, f: factor de corrección. (Tomado de www.lauda.de).

Otra versión es el procedimiento cuasiestático. Consiste en un proceso en dos etapas y se aplica sólo cuando el sistema contiene agentes tensioactivos. En el primer paso una gota de volumen finito se forma muy rápidamente. El volumen finito debe ser más pequeño que el volumen crítico que corresponde a

la tensión interfacial real en la superficie de la gota. Después de que cesa el flujo de líquido, la gota tiene un volumen constante y la tensión interfacial decrece sólo debido a la adsorción de un agente tensioactivo. Dado que el volumen elegido en el primer paso no es demasiado pequeño, la gota caerá después de alcanzarse una determinada tensión interfacial de acuerdo a dicho volumen. Después del desprendimiento de la gota, la siguiente gota se forma eligiendo el mismo volumen o un volumen diferente. El resultado de este experimento es compatible con el obtenido con otros métodos cuasiestáticos como el método del anillo [\(Miller y col., 1992\)](#).

En el método dinámico, se puede medir la tensión interfacial en intervalos amplios que van desde 0,1 segundos a varias horas. Cuando la velocidad de formación de la gota (en segundos/ μL) es muy alta (y por ende a tiempos de desprendimiento de gota muy cortos), el método dinámico propiamente dicho no puede aplicarse sin una corrección posterior [\(Miller y col., 1992\)](#). Experimentalmente se ha observado que para los líquidos puros, el volumen de las gotas desprendidas es mayor a mayores velocidades de formación (en realidad los volúmenes deberían ser similares porque no hay agentes tensioactivos que sean capaces de disminuir la tensión interfacial). Empíricamente se ha observado que:

$$V(t) = V_e + St^{-3/4} \quad (2.22)$$

donde V_e : es un volumen no perturbado (sin el efecto) de la gota, S : es el coeficiente de la relación lineal, y t : es el tiempo.

Como es de esperar, a bajas velocidades de formación y por ende, valores elevados de tiempo, este efecto se minimiza ($V(t) \rightarrow V_e$ cuando $t \rightarrow \infty$). Este efecto recibe el nombre de efecto hidrodinámico y se basa en la siguiente descripción física: una gota que ha alcanzado su volumen crítico comienza a desprenderse. Este proceso tiene un tiempo limitado, por lo tanto durante el desprendimiento, cuando la velocidad de formación es muy elevada hay un pasaje adicional de líquido (V_a), por lo que el volumen de la gota es mayor. El efecto hidrodinámico da una sobre-estimación de γ en el rango de altas velocidades de formación. La magnitud de V_a depende de la viscosidad del líquido, de su tensión interfacial y del diámetro del capilar. En este intervalo problemático, el equipo tiene una versión (método dinámico con flujo reducido) que permite realizar las mediciones minimizando el efecto hidrodinámico.

$$V_a = t_o F \quad (2.23)$$

$$F = \left(\frac{V_e}{(t - t_o)} \right) = \frac{V(t)}{t} \quad (2.24)$$

$$V(t) = V_e [1 + t_o (t - t_o)] = \frac{V_e t}{(t - t_o)} \quad (2.25)$$

$$t_o = \alpha(\eta) + \beta(\eta) r_{cap} \quad (2.26)$$

donde F es el flujo de líquido por unidad de tiempo, α y β son funciones lineales de la viscosidad (η).

Se asume que la corrección del efecto hidrodinámico es equivalente para sistemas que contienen agentes surfactantes y tiene que ser aplicado en cada caso particular para obtener los parámetros de corrección [\(Miller y col., 1992\)](#).

2.6.- Determinación de las propiedades espumantes

El estudio de formación y estabilidad de espuma se realizó mediante el método conductimétrico desarrollado por Loisel y col., 1993, con pequeñas modificaciones. La espuma fue generada por burbujeo de aire a través de una placa de vidrio sinterizado, siendo el poro mayor cuanto menor es el número que lo define, el vidrio utilizado fue de tipo G4 con un caudal de 100 mL/min hasta generar un volumen de espuma preestablecido de 60 mL. El ensayo se realizó utilizando 10 mL de dispersión de las distintas muestras obtenidos en una concentración de proteína de 1 mg/mL en fosfato de sodio 10 mM, pH 7,5.

El estudio de la formación de espuma se abordó desde dos aspectos uno cuantitativo considerando dos parámetros vinculados a la formación de espuma V_i y V_{LEmax} y otro cualitativo como lo es el tamaño de las burbujas.

La cinética de desestabilización se analizó basándose en los parámetros (k_g , k_d , V_g y V_d) que surgen de la aplicación del modelo cinético desarrollado por Panizzolo 2005.

Las determinaciones corresponden a réplicas por triplicado que a su vez se ensayaron cada una por triplicado.

2.6.1. Descripción del equipo utilizado

El equipo de análisis de propiedades de espumado TIAV 2002 fue construido en base al modelo desarrollado por Loisel y col. (1993) en INRA (Francia). Es un equipo de espumado por burbujeo, que permite analizar la formación y estabilidad de la espuma por medida conductimétrica sobre la solución espumada y simultáneamente seguir la variación de volumen de espuma por detección visual. El equipo consiste en un tubo de acrílico transparente graduado en volumen, de 3 cm de diámetro y 30 cm de altura, equipado con un par de electrodos verticales localizados en su base y con un disco poroso de vidrio (G4). La solución o dispersión de proteínas es introducida dentro del tubo hasta cubrir los electrodos (10 mL). La espuma se genera por pasaje de aire a un caudal constante regulado mediante un rotámetro y por medio de un conductímetro se determina la conductividad de la solución de proteína y los datos son transferidos a una PC para su posterior análisis. Simultáneamente se registra el volumen de espuma durante su formación de la espuma por observación visual y el tiempo en forma directa en la PC utilizando una tecla como función de cronómetro controlando el reloj interno (Figura 2.8).

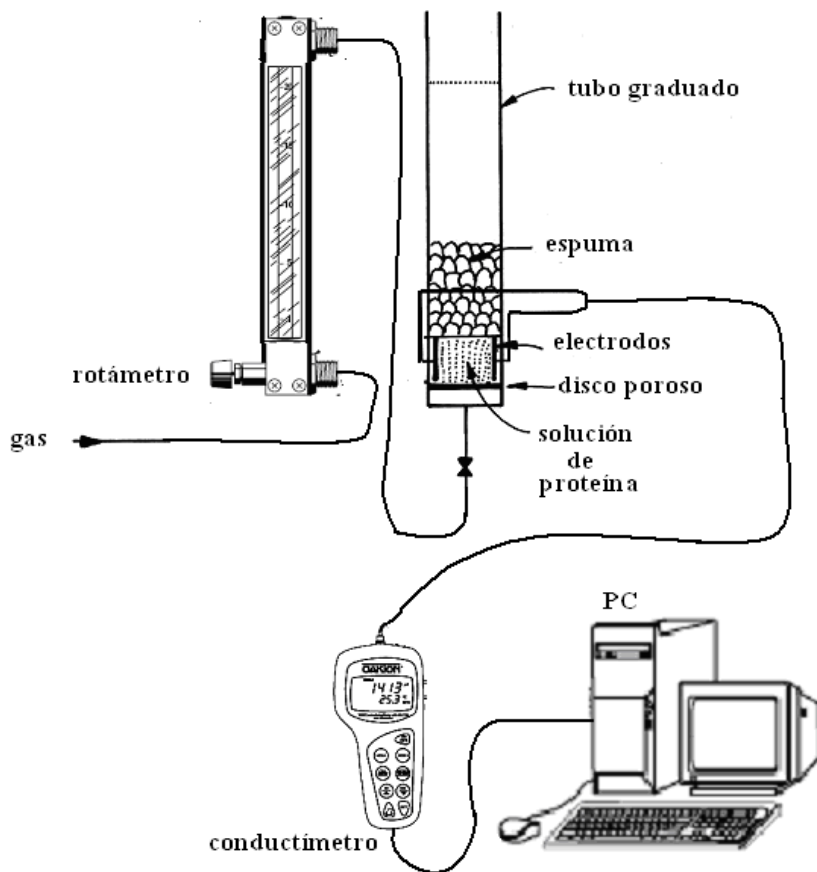


Figura 2.8. Representación esquemática del equipo TIAV 2002.

2.6.2 Determinación de parámetros de formación de espumas

La medida conductimétrica de la fase líquida permite determinar el volumen de líquido en la espuma (V_{LE}) en función del tiempo:

$$V_{LE}(t)(mL) = \left(\frac{Ct(\mu S)}{Ci(\mu S)} \right) \times V_{Li}(mL) \quad (2.27)$$

donde $V_{LE}(t)$: volumen de líquido en la espuma a un tiempo t , V_{Li} : volumen de solución de proteína inicial, Ci : conductividad inicial (correspondiente al V_{Li}), Ct : conductividad a tiempo t .

A partir de V_{LE} se pueden calcular varios parámetros de formación de espuma (Figura 2.9). El volumen máximo de líquido retenido en la espuma (V_{LEmax}) y la velocidad de pasaje del líquido a la espuma (v_i), dada por la pendiente inicial de la curva V_{LE} vs t parámetro propuesto por Wagner y col.

$$v_i(mL/s) = \left(\frac{\Delta V_{LE}}{\Delta t} \right)_i \quad (2.28)$$

(1996):

Este parámetro da información del comportamiento superficial de la proteína en la etapa inicial de formación de la espuma, en la cual los procesos de desestabilización son incipientes (Wagner y col., 1996).

Simultáneamente por medida óptica se registra el volumen de espuma en función del tiempo; la pendiente de la recta resultante da el valor de la capacidad espumante:

$$CE(mL/s) = \left(\frac{\Delta VE}{\Delta t} \right) \quad (2.29)$$

o en función del gas insuflado

$$CE(mL/mL_{gas}) = \left(\frac{\Delta VE}{\Delta VG_i} \right) \quad (2.30)$$

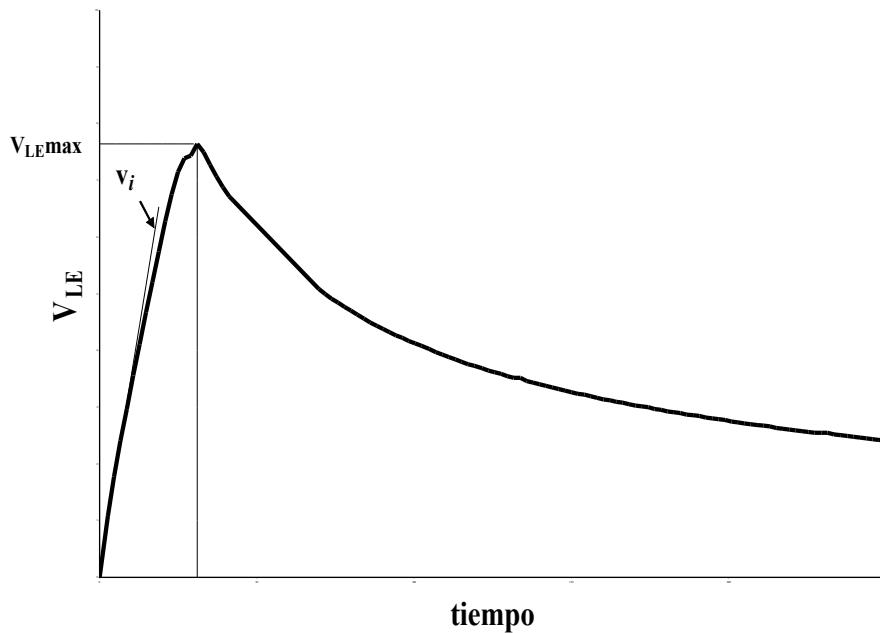


Figura 2.9. Curva experimental de VLE en función del tiempo. V_{LEmax} volumen máximo de líquido retenido en la espuma y v_i velocidad de pasaje del líquido a la espuma.

El tamaño y forma de las burbujas si bien no se determinó cuantitativamente se observó de manera cualitativa utilizando para esto fotografías tomadas con una cámara digital SONIC W55. Estas imágenes fueron obtenidas cuando el volumen de espuma llegó a 10 mL (correspondiente a un período de burbujeo de aproximadamente 5 segundos), a 60 mL (volumen de espuma al momento de finalizar el burbujeo) y luego de haber estado una hora en reposo (relacionada con la estabilidad de la espuma).

2.6.3 Determinación de parámetros de estabilidad de espumas

Para el proceso de desestabilización de la espuma han sido sugeridos diversos procesos cinéticos y a su vez distintos criterios de determinación de los parámetros correspondientes a las diferentes ecuaciones planteadas (Monsalve y Schechter, 1984; Wright y Hemmant, 1987; Kim y Kinsella, 1985; Elizalde y col., 1991; Yu y Damodaran, 1991; Wagner y col., 1996).

En este trabajo se utiliza el modelo de segundo orden con dos términos propuesto por Panizzolo (2005).

$$V(t) = \frac{V_g^2 k_g t}{(V_g k_g t + 1)} + \frac{V_d^2 k_d t}{(V_d k_d t + 1)} \quad (2.31)$$

donde k_g ($\text{ml}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$): es la constante de velocidad correspondiente al proceso de drenado gravitatorio, k_d ($\text{ml}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$): es la constante de velocidad correspondiente al proceso de difusión de gas o desproporción, V_g y V_d (mL): son los parámetros de amplitud correspondiente al proceso de drenado gravitatorio y al proceso de difusión de gas o desproporción.

2.7.- Determinación de las propiedades emulsionantes

2.7.1. Preparación de emulsiones

Se prepararon emulsiones aceite en agua 25:75 (vol/vol) utilizando las distintas muestras a una concentración de proteína de 1,0 mg/mL en disolución de fosfato de sodio 0,01 M, pH 7.5. Las emulsiones fueron preparadas a temperatura ambiente con un homogenizador Ultra-turrax T25 (IKA-Labor Technik, GmbH & Co., Staufen, Alemania). La velocidad del rotor (S25N-10G, GmbH & Co., Staufen, Alemania) se ajustó en 20.000 r.p.m. y el tiempo de homogeneización fue de 1 minuto.

2.7.2. Ensayos de caracterización de las emulsiones

2.7.2.1 Porcentaje de proteína adsorbida y concentración proteica interfacial

La concentración de proteína en la interfase (Γ) de la emulsión se determinó según el método descrito por Puppo y col. (2005). Dos mL de emulsión recién preparada fueron diluidos en 2 mL de solución de sacarosa (500 g/L en solución Tris-HCl 0,1 M, pH 7). Dos mL de esa mezcla fueron depositados delicadamente en el fondo de un tubo de centrifuga conteniendo 10 mL de solución reguladora de pH cuyas propiedades fisicoquímicas son idénticas a las de la muestra de dispersión de la proteína utilizada en la preparación de las emulsiones. Los tubos fueron centrifugados a 3.000 xg durante 2 horas a 10 °C. Después de la centrifugación los tubos se congelaron

a -20 °C y fueron cortados a la altura de los 4,5 mL obteniéndose dos volúmenes. Las proteínas absorbidas en la interfase fueron desorbidas mezclando el volumen superior con 20 mL de solución de SDS 1%, la mezcla fue centrifugada a 3.000 xg durante 1 hora 10 °C obteniéndose dos fases. La fase acuosa inferior, que contenía la proteína desorbida, fue extraída mediante una jeringa. La concentración de proteína adsorbida y no adsorbida fue determinada por el método de Markwell y col. (1978). La concentración de proteína en interfase fue calculada según la expresión:

$$\Gamma \left(\frac{mg}{m^2} \right) = \frac{Pa \left(\frac{mg}{mL \text{ emulsion}} \right)}{Sv \left(\frac{m^2}{mL \text{ emulsión}} \right)} \quad (2.32)$$

donde Γ es la concentración de proteína en interfase, [Pa] es la concentración de proteína adsorbida en la emulsión y Sv es el área interfacial.

Las determinaciones fueron realizadas al menos por duplicado.

2.7.2.2 Tamaño de partícula de las emulsiones

La distribución de tamaño de partícula de las diferentes emulsiones se determinó por difracción de luz láser y dispersión de luz polarizada utilizando un analizador de partículas Coulter Counter Multisizer (Coulter Electronics Ltd.) Combinando ambas tecnologías se puede obtener la distribución de tamaño de partículas en un rango de 0.04 μm hasta 2000 μm .

El análisis se realizó sobre las emulsiones preparadas según lo descrito en el ítem 2.7.1 con y sin tratamiento con buffer Tris/HCl 50 mM, pH 8,0 SDS 1 % en proporción 1:1 para asegurar la completa defloculación de la emulsión (Anton y col., 2002).

A partir de la distribución de tamaño de partícula expresada como % volumen (% V) o como % superficie (% S) se obtuvieron los diferentes diámetros promedio: D3,2 y D4,3. Los diámetros promedio describen los diferentes tamaños que presentan un conjunto de partículas. En el caso del diámetro de la esfera de área superficial equivalente D_{3,2}, también denominado diámetro medio de Sauter se expresa

y el diámetro de la esfera de volumen equivalente $D_{4,3}$, también denominado

$$D_{3,2} = \frac{\sum D_i^3}{\sum D_i^2} \quad (2.33)$$

diámetro medio de De Broucker:

$$D_{4,3} = \frac{\sum D_i^4}{\sum D_i^3} \quad (2.34)$$

En ambas expresiones el número de partículas no aparece ni en el numerador ni en el denominador de la ecuación, por lo que técnicas como la de difracción Láser, que miden una distribución proporcional a D^3 no necesitan conocer el número de partículas para llegar a determinar el resultado medio.

A partir de los valores de $D_{4,3}$ se calculó el grado de floculación (GF %) como:

$$(GF = [(D - D_{SDS}) / D_{SDS}] \times 100) \quad (2.35)$$

Aunque estos parámetros podrían calcularse también a partir del diámetro promedio de Sauter $D_{3,2}$, es más conveniente utilizar $D_{4,3}$ debido a que los cambios producidos en las emulsiones son detectados con mayor sensibilidad (Relkin y Sourdet, 2005). La diferencia de valores de diámetro promedio obtenidos en ausencia y presencia de la solución conteniendo SDS, se tomó como una medida de formación de flóculos o agregados en la emulsión (Anton y col., 2002). Las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

2.7.2.2.1. Descripción del equipo utilizado

El Coulter Counter Multisizer, consiste en un láser de He Ne como fuente de luz intensa coherente con una longitud de onda fija ($\lambda = 0,63 \mu\text{m}$) que ilumina las partículas dispersas en la zona de medida. Este, luego es enfocado por lentes de Fourier hacia un detector que consiste en un gran número de elementos fotosensibles colocados radialmente. El detector normalmente es una lámina de silicio fotosensible, que dispone de varios detectores que son capaces de producir simultáneamente medidas basadas en el volumen de las partículas a una velocidad de 500 detecciones/seg. En el intervalo entre 1 nm y 1 μm , aproximadamente, es utilizada la técnica de espectroscopía de correlación fotónica, pero la intensidad de luz dispersada es tan baja que es necesaria la incorporación de un tubo fotomultiplicador junto con un correlacionador de señal para hacer significativa la información. Las

partículas en suspensión son medidas con la ayuda de un sistema de recirculación que las hace pasar al interior de la celda de medida por donde pasa el haz del láser.

La intensidad de la luz desviada se mide por la aplicación de un modelo óptico que permite calcular el patrón de dispersión. La distribución volumétrica del tamaño de partícula que se ajusta mejor con el patrón medido es calculada por el programa del equipo haciendo uso de la teoría de Fraunhofer que asume las siguientes suposiciones:

- Las partículas son mucho más grandes que la longitud de onda empleada. La norma ISO13320 establece que esto se cumple cuando el tamaño de la partícula es mayor de 40λ , por ejemplo $25\ \mu\text{m}$ cuando sea utilizado un equipo que disponga de un láser de He-Ne ($\lambda = 0,63\ \mu\text{m}$).
- Todos los tamaños de partícula dispersan luz con la misma eficiencia.
- La partícula es opaca y no transmite luz.

Mediante el programa del equipo la información es procesada y es generada directamente una distribución de volumen, o también de área y del número de partículas, en función del tamaño de partícula (Figura 2.10), como así también una tabla de parámetros descriptores de la distribución de tamaño de partícula de la muestra analizada, entre ellos $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ (Figura 2.11). El sistema de recirculación que proporciona una alta reproducibilidad, permite además, la incorporación de aditivos, dispersantes y surfactantes como SDS que ayudan a determinar el tamaño correcto de partícula.

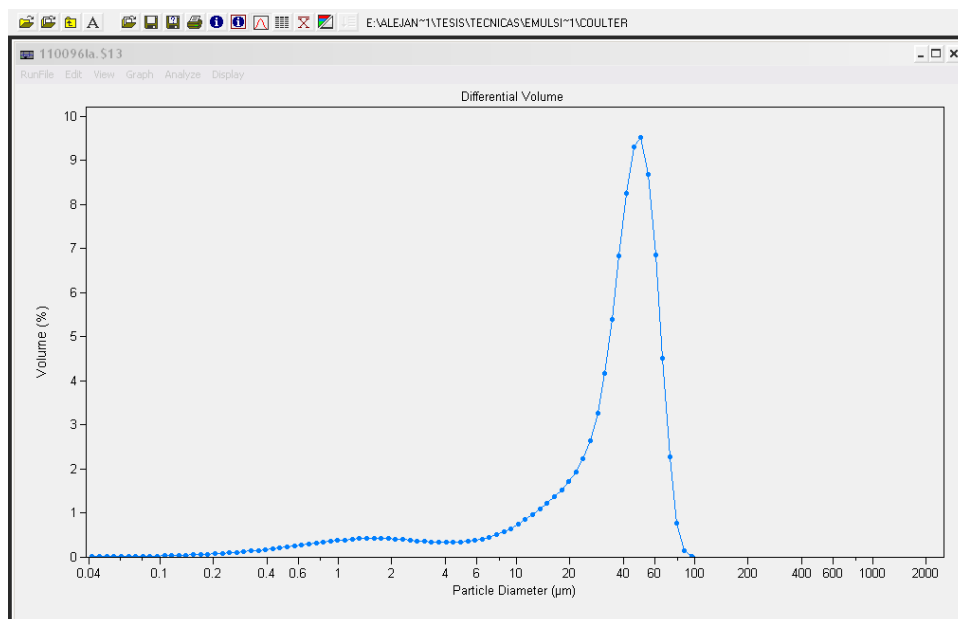


Figura 2.10. Distribución de volumen en función del tamaño de partícula tal como la proporciona el programa del equipo Coulter Counter Multisizer (Coulter Electronics Ltd.)

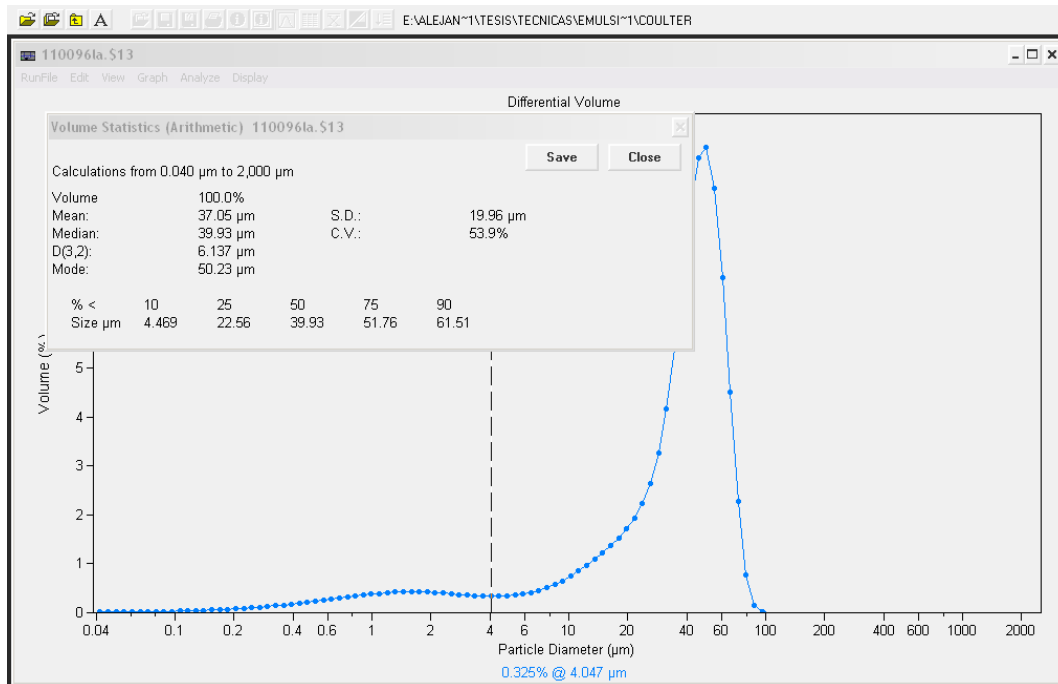


Figura 2.11. Tabla de parámetros descriptores de la distribución de tamaño de partícula de la muestra analizada tal como la proporciona el programa del equipo Coulter Counter Multisizer (Coulter Electronics Ltd.)

2.7.2.3 Microestructura de emulsiones

La microestructura de las emulsiones se evaluó colocando alícuotas de 10 µL de emulsión (sin o con dilución previa) sobre un portaobjetos. El cubreobjetos (22 × 22 mm) se colocó cuidadosamente y sin deslizamiento para no inducir la coalescencia de las gotas de aceite. Las emulsiones se observaron con un microscopio óptico Leica DLMB (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) con una cámara digital adaptada (Leica DC100, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania), operando con un aumento de 100 y 200 X

2.7.3 Determinación de la estabilidad de las emulsiones

La estabilidad global de las emulsiones se analizó usando un analizador óptico vertical (Turbiscan Classic MA2000, Formulacion, Toulouse, France). Las emulsiones recientemente preparadas se colocaron en una celda cilíndrica de vidrio (80 mm) para registrar los perfiles de transmitancia (T %) y backscattering (BS %) o retrodispersión, en función de la altura en la celda. Se

realizó el estudio de las cinéticas de cremado y desestabilización de las emulsiones mediante la medida de retrodispersión cada minuto durante un período de 60 minutos y una posterior y única medida a las 24 horas.

2.7.3.1 Estabilidad de la emulsión frente al cremado

La estabilidad frente al cremado se estudió a través de la disminución de los valores promedio de la retrodispersión en la parte inferior (zona 10-20 mm, RD_{p10-20}) del tubo de medida en función del tiempo.

Dado que las muestras presentaron un perfil de RD de tipo sigmoideo la magnitud e incidencia de las desviaciones a la Ley de Stokes serían tales que las gotas tendrían impedido el movimiento en el primer intervalo del proceso de cremado, pero con el transcurso del tiempo los efectos que retardan el proceso disminuirían su magnitud e incidencia de modo de que la velocidad de cremado pasaría a tener un comportamiento similar al de las emulsiones que presentan un perfil de tipo hiperbólico. En este caso un modelo cinético con dos términos, uno de tipo hiperbólico y otro de tipo sigmoideo, describe adecuadamente el proceso de cremado de estas emulsiones. La expresión que describe el comportamiento es:

$$RD(t) = \left(\frac{RD_h}{RD_h K_h t + 1} \right) + \left(\frac{2^2 \cdot RD_s}{2^2 + (k_s RD_s)^2 \cdot t^2} \right) \quad (2.36)$$

donde $RD(t)$ es el valor de RD a tiempo t , k_h es la constante de velocidad de variación de RD en función del tiempo para una cinética de tipo hiperbólica, k_s es la constante de velocidad de variación de RD en función del tiempo para una cinética de tipo sigmoidea y RD_h y RD_s son los parámetros de amplitud correspondientes a cada una de las cinéticas respectivamente, tales que $RD_h + RD_s = RD_i$, RD_i es el valor de RD inicial

Los valores de k_h , k_s , RD_h y RD_s fueron estimados mediante regresión por cuadrados mínimos

2.7.3.2. Estabilidad de la emulsión frente a la floculación y coalescencia

La desestabilización global de las emulsiones se estudió mediante el cambio de los valores promedio de retrodispersión en la zona 50-53 mm (RD_{p50-53})

53) en función del tiempo y el cálculo de D(%) (Palazolo y col., 2005) según la expresión:

$$D(\%) = \frac{(RD_{p_{\max}} - RD_{p_{24}})}{RD_{p_{\max}}} \times 100 \quad (2.37)$$

Donde D(%): grado de desestabilización global, $RD_{p_{\max}}$: promedio del máximo valor de retrodispersión en el tiempo en un intervalo determinado y $RD_{p_{24}}$: promedio del valor de retrodispersión a 24 horas en un intervalo determinado.

Los valores de D(%) (Ecuación 2.37) fueron obtenidos de los perfiles de RD, este parámetro permitió cuantificar la desestabilización global de la fase crema desde su formación hasta el final de su almacenamiento (24 horas). Puesto que es un índice de la disminución de RD_p , asociada a un número más bajo de partículas, este puede ser relacionado con la coalescencia y/o floculación.

Las determinaciones corresponden a réplicas por triplicado que a su vez se ensayaron cada una por triplicado.

2.7.3.3. Grado de hidratación

El grado de hidratación de la fase crema se estimó a partir del volumen relativo de fase crema (V_r) calculado de los perfiles de BS % correspondiente a las 24 horas de almacenamiento y mediante la fracción volumétrica de la fase dispersa (ϕ).

El volumen relativo de la fase crema (V_r) se determinó a partir del perfil de BS a las 24 horas de almacenamiento como:

$$V_r = \frac{\text{longitud de la fase crema (mm)}}{\text{longitud total (fase crema + suero) (mm)}} \quad (2.38)$$

La sección transversal del tubo es constante y por ende la relación de longitudes se relacionó de manera directa a la relación de volúmenes.

Las determinaciones se realizaron por triplicado.

$$GHidratación = \frac{\phi}{V_r} \quad (2.39)$$

2.7.3.4. Descripción del equipo para determinar la estabilidad en emulsiones por dispersión múltiple de la luz.

El equipo Turbiscan Classic MA 2000 Formulation (Toulouse, France) permite el análisis de la desestabilización física de dispersiones líquidas concentradas (emulsiones y suspensiones). El principio de funcionamiento de este instrumento se basa en la dispersión múltiple de la luz. Es un analizador óptico de exploración vertical cuya representación esquemática se muestra en la Figura 2.12. Consta de un cabezal de detección que se mueve de arriba hacia abajo a lo largo de una celda de vidrio cilíndrica. El cabezal de detección está compuesto por una fuente de luz del infrarrojo cercano ($\lambda = 850 \text{ nm}$) y dos detectores sincrónicos. El detector de transmisión recibe la luz que atraviesa la muestra, 180° del haz de luz incidente, mientras que el detector lateral recibe la luz desviada por la muestra a 45° del haz de luz incidente Figura 2.13.

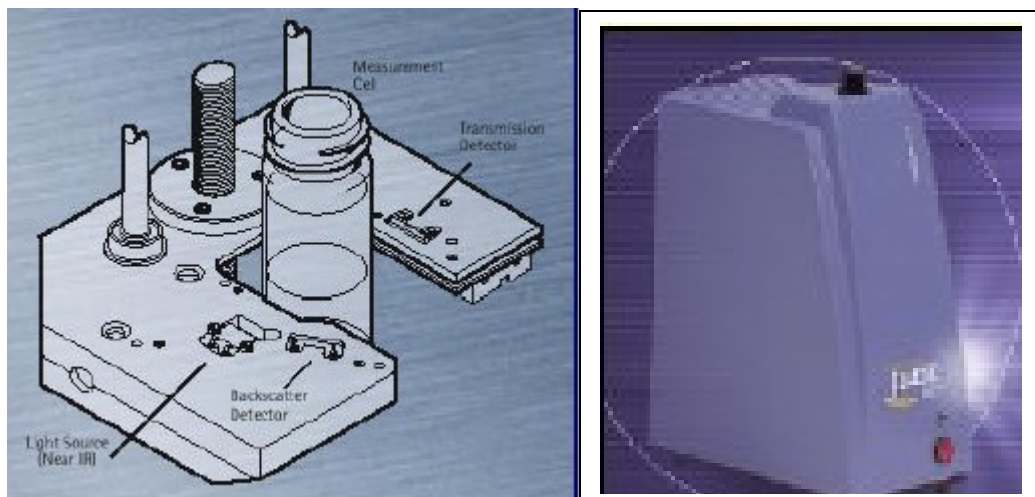


Figura 2.12. Representación esquemática, simplificada y fotografía del analizador óptico de exploración vertical (Manual-Turbiscan Classic MA2000,Formulation, Toulouse, France)

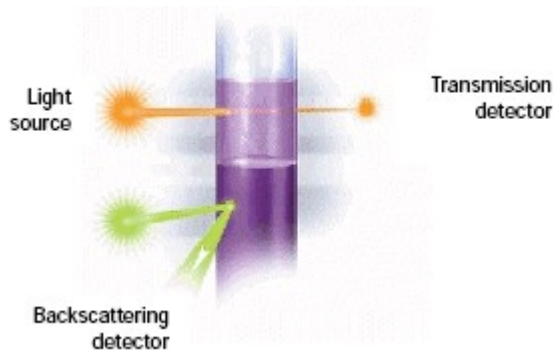


Figura 2.13 Principio de medida del turbiscan (Manual- Turbiscan Classic MA2000, Formulacion, Toulouse, France)

El cabezal de detección explora la longitud total de la muestra (aproximadamente 60 mm), adquiriendo datos de transmisión y retrodispersión cada 40 μm (1625 adquisiciones de transmisión y retrodispersión por exploración).

Los flujos de medida se calibran con un estándar de reflectancia que no adsorbe (perlas de latex de poliestireno) y un estándar de transmitancia (aceite de silicona). La señal primero es tratada por un convertidor de corriente a voltaje. Un microprocesador integrado maneja la adquisición de datos, la conversión analógica a digital, el almacenamiento de datos, el control del motor y la intercomunicación con la computadora. Los resultados son representados en la pantalla de la computadora en curvas que presentan el porcentaje de luz transmitida y retrodispersada en función de la longitud del tubo de medida de la muestra Figura 2.14 y 2.15.

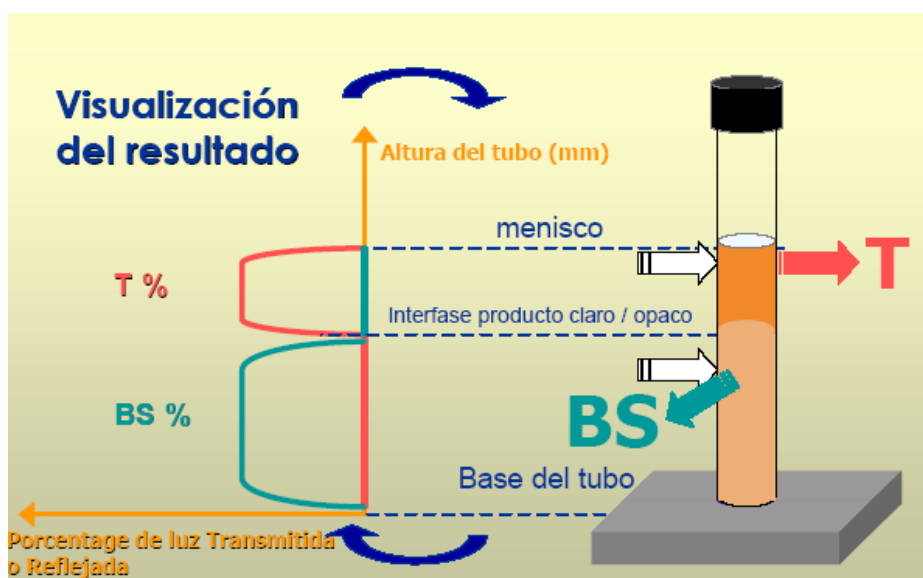


Figura 2.14 Forma de visualizar luz transmitida y retrodispersada en función de la longitud del tubo de medida de la muestra

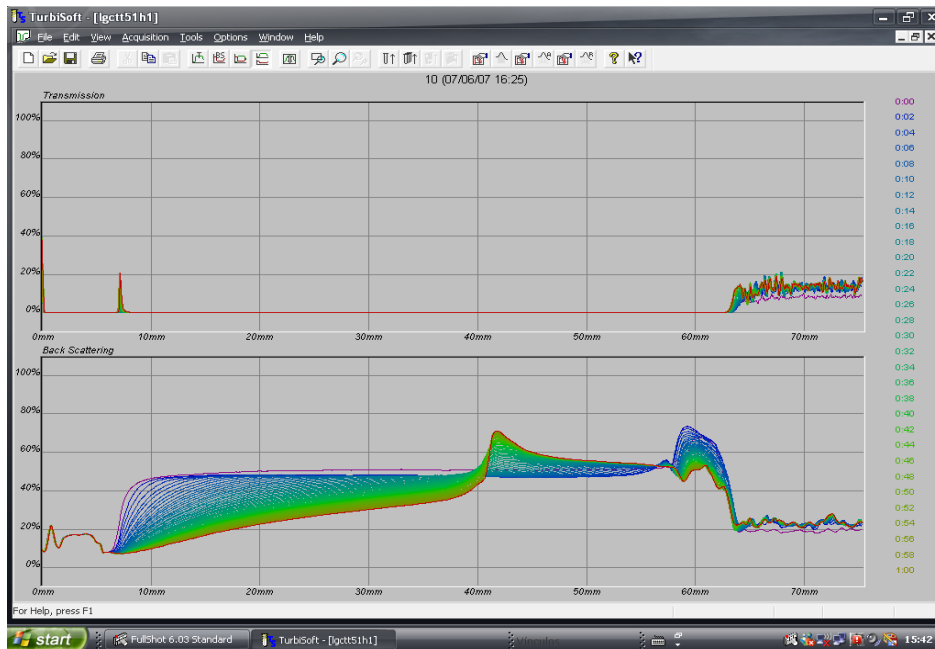


Figura 2.15 Curvas que presentan el porcentaje de luz transmitida y retrodispersada en función de la longitud del tubo de medida de la muestra, tal como son presentados por el programa del equipo Turbiscan.

El análisis puede repetirse con una frecuencia programable y los resultados se van acumulando en el gráfico en función del tiempo. La estabilidad o la inestabilidad del producto pueden entonces ser determinada analizando estos datos.

La inestabilidad de las dispersiones resulta frecuentemente ser debida a dos procesos físicos distintos: un aumento del tamaño de partícula debido a la coalescencia o a la floculación y a la migración de la partícula dentro de las muestras que dan lugar al cremado. Cuando no existen cambios de la fracción del tamaño o del volumen de la partícula los valores de retrodispersión (RD) y de transmisión (T) siguen siendo constantes y todas las exploraciones correspondientes a distintos tiempo de medida se sobreponen (Figura 2.16a). Si ocurriera un aumento del tamaño de partícula (floculación o coalescencia) a lo largo de toda la muestra se inducen cambios en λ^* o λ y por lo tanto RD y T varían en las exploraciones correspondientes a distintos tiempos de medida, presentando RD una disminución de los valores en las sucesivas exploraciones (Figura 2.16b). Cuando se produce un fenómeno de cremado de las partículas se inducen cambios de la fracción del volumen de partículas a lo largo de la muestra, disminuye en la parte inferior y aumenta en la parte superior, por lo tanto RD y T también varían, presentando RD una disminución de los valores en la zona inferior, progresivamente a lo largo de la muestra y a su vez un

aumento progresivo en la zona superior en las sucesivas exploraciones (Figura 2.16c). A su vez los procesos de aumento de tamaño y migración de partícula pueden ocurrir simultáneamente.

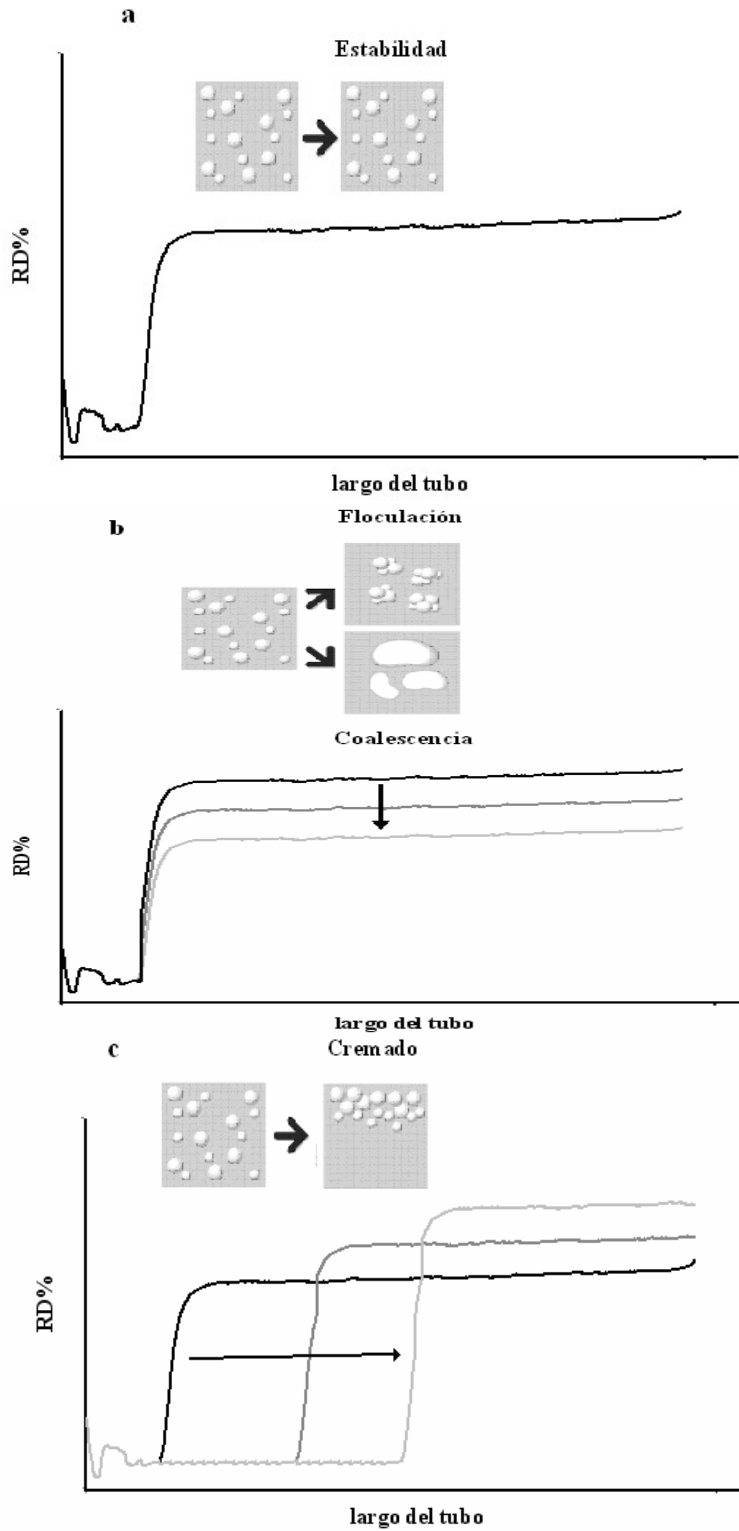


Figura 2.16. Representación esquemática de los cambios ocurridos en los procesos de a) estabilidad, b) floculación y/o coalescencia y c) cremado y sus efectos en los perfiles de retrodispersión.

2.8. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de datos se realizó en todos los casos mediante análisis de la varianza (ANOVA) con $\alpha = 0,05$ y la comparación de medias por la prueba de mínimas diferencias significativas (LSD) con $\alpha = 0,05$, utilizando el programa Statgraphics plus 7.0.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERIZACION FISICOQUÍMICA- ESTRUCTURAL

3.1. Glicosilación no enzimática de β -Lactoglobulina

La β -Lactoglobulina se utiliza como ingrediente alimentario por sus propiedades funcionales, por lo que mejorar estas características sin hacer modificaciones tóxicas es de gran interés para el sector alimentario.

La glicosilación de los grupos amino de las proteínas a través de su unión covalente con grupos carbonilos de azúcares reductores, mediante la conocida Reacción de Maillard, aparece como un modo eficaz de modificar sus propiedades funcionales. Esto se debe a los cambios físicos y químicos que se producen, tales como el tamaño, la forma, la composición, la carga neta y la distribución de cargas, la relación hidrofobicidad/hidrofilicidad, modificación en las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias, la flexibilidad o rigidez molecular y la capacidad de interactuar con otros componentes del alimento. Además, a diferencia de otros métodos de glicosilación de proteínas, la reacción de Maillard no requiere el uso de aditivos químicos que podrían suponer un problema en la alimentación.

En el presente trabajo se desarrollaron distintos compuestos por la unión de carbohidratos con β -Lactoglobulina vía reacción de Maillard, con el fin de poder utilizarlos como ingredientes funcionales en alimentación. Se realizaron modificaciones de β -Lactoglobulina utilizando glucosa, lactosa y dextrano bajo diferentes condiciones de reacción. Mediante ensayos previos se seleccionaron las condiciones de reacción más adecuadas para el estudio. Se seleccionó el pH de 7, la temperatura de 50°C, la relación molar proteína:

carbohidrato (1:10 y 1:100) y los tiempos de reacción 51 y 96 horas. Se seleccionó la actividad de agua (a_w) de 0,65 para realizar las modificaciones, ya que con esta (a_w) se logró un mayor grado de glicosilación. Para realizar el estudio de las propiedades funcionales se eligió el pH de 7,5 dado que la β -Lactoglobulina presentó mejores propiedades espumantes y emulsionantes en ese valor.

3.2.-Caracterización fisicoquímica-estructural de los compuestos obtenidos

Las 12 muestras de β -Lactoglobulinas glicosiladas (10 51 G, 10 96 G, 100 51 G, 100 96 G, 10 51 L, 10 96 L, 100 51 L, 100 96 L, 10 51 D, 10 96 D, 100 51 D, 100 96 D) y los 3 blancos de reacción (Lg s tt, Lg c tt 51 h y Lg c tt 96 h) fueron caracterizadas fisicoquímica y estructuralmente. Se seleccionaron los blancos para poder diferenciar el efecto del tratamiento térmico de los cambios producidos por la glicosilación.

3.2.1.-Solubilidad

Tabla 3.1. Índice de Solubilidad (IS) de las muestras estudiadas

<i>Muestra</i>	<i>Índice de Solubilidad (%)</i>
<i>Lg s tt</i>	72 ± 2 a
<i>Lg c tt 51h</i>	77 ± 4 a
<i>Lg c tt 96h</i>	75 ± 3 a
<i>10 51 G</i>	72 ± 7 a
<i>10 96 G</i>	71 ± 4 a
<i>100 51 G</i>	72 ± 7 a
<i>100 96 G</i>	71 ± 2 a
<i>10 51 L</i>	73 ± 9 a
<i>10 96 L</i>	78 ± 8 a
<i>100 51 L</i>	72 ± 8 a
<i>100 96L</i>	74 ± 10 a
<i>10 51 D</i>	78 ± 8 a
<i>10 96 D</i>	72 ± 6 a
<i>100 51 D</i>	78 ± 8 a
<i>100 96 D</i>	80 ± 8 a

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0.05$)

La solubilidad de las dispersiones acuosas de las muestras glicosiladas y sus blancos fue mediante su dispersión en solución de fosfato de sodio 10 mM pH 7,5 al 1 % p/v, según lo descrito en la sección 2.3.2. No

encontrándose diferencias significativas en el % de solubilidad entre las muestras analizadas (Tabla 3.1).

El tratamiento térmico a 50° C y la reacción con el azúcar pueden provocar una desnaturalización parcial de la β -Lactoglobulina, sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la solubilidad de las dispersiones estudiadas. Este hecho puede ser atribuido a la formación de agregados que se mantienen dispersos en el medio utilizado (Jimenez-Castaño y col., 2005).

3.2.2.- Análisis de la variación de peso molecular

3.2.2.1 Espectrometría de masa MALDI-TOF

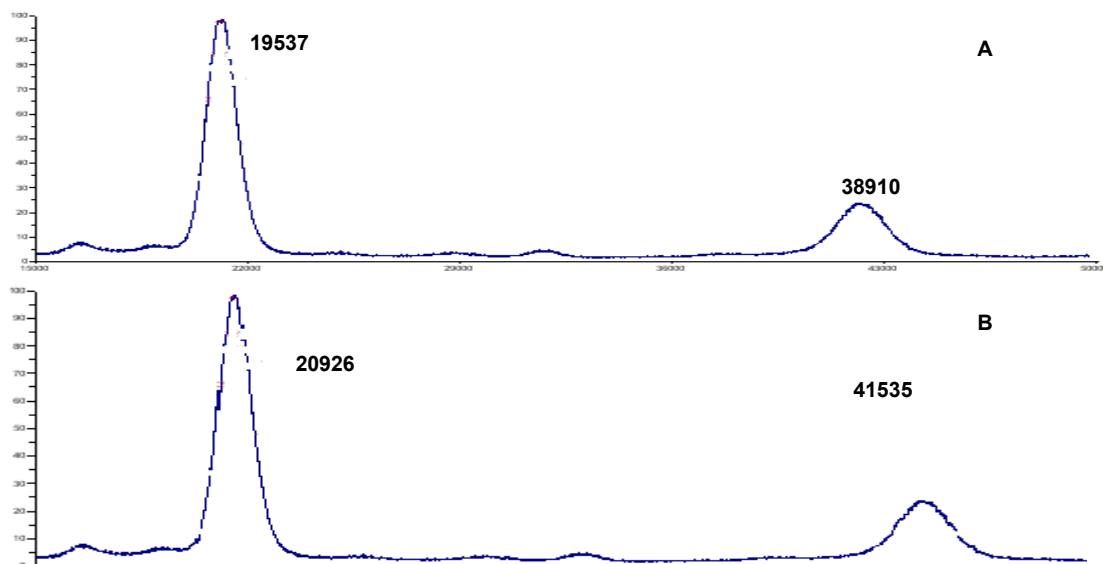
El uso de Matrix-assisted Laser Desorption/ionization Time-of-flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) permite medir con gran precisión y resolución la masa molecular de las muestras a estudiar. Por lo tanto este método es adecuado para diferenciar los cambios estructurales de las proteínas durante la glicosilación y aporta información acerca de cuantos grupos carbohidratos se han unido a la molécula de β -Lactoglobulina en cada condición de reacción, debido al aumento en la masa molecular de los espectros.

Tabla 3.2: Numero medio de carbohidratos unido por monómero de β -Lactoglobulina de las muestras estudiadas

<i>Muestra</i>	<i>Nº medio de carbohidratos unidos</i>
<i>10 51 G</i>	7
<i>10 96 G</i>	8
<i>100 51 G</i>	15
<i>100 96 G</i>	19
<i>10 51 L</i>	6
<i>10 96 L</i>	7
<i>100 51 L</i>	7
<i>100 96L</i>	8
<i>10 51 D</i>	4
<i>10 96 D</i>	4
<i>100 51 D</i>	4
<i>100 96 D</i>	4

En la figura 3.1 se presentan los espectros obtenidos de 10 96 G; 10 96 L, 10 96 D y Lg c tt 96 h, en estos se pueden observar los picos correspondientes a la forma monomérica y dimérica de la β -Lactoglobulina.

La glicosilación de la proteína produjo un corrimiento a PM mayores y un aumento en la amplitud de los picos. La diferencia entre el PM del monómero modificado y el monómero sin glicosilar esta relacionado con el valor medio de carbohidratos unidos a la β -Lactoglobulina. Este parámetro se utilizó para evaluar el grado de avance de la reacción, los resultados obtenidos se presentan en la (Tabla 3.2). Se puede apreciar el comportamiento diferente presentado por glucosa, lactosa y dextrano en la glicosilación de la β -Lactoglobulina.



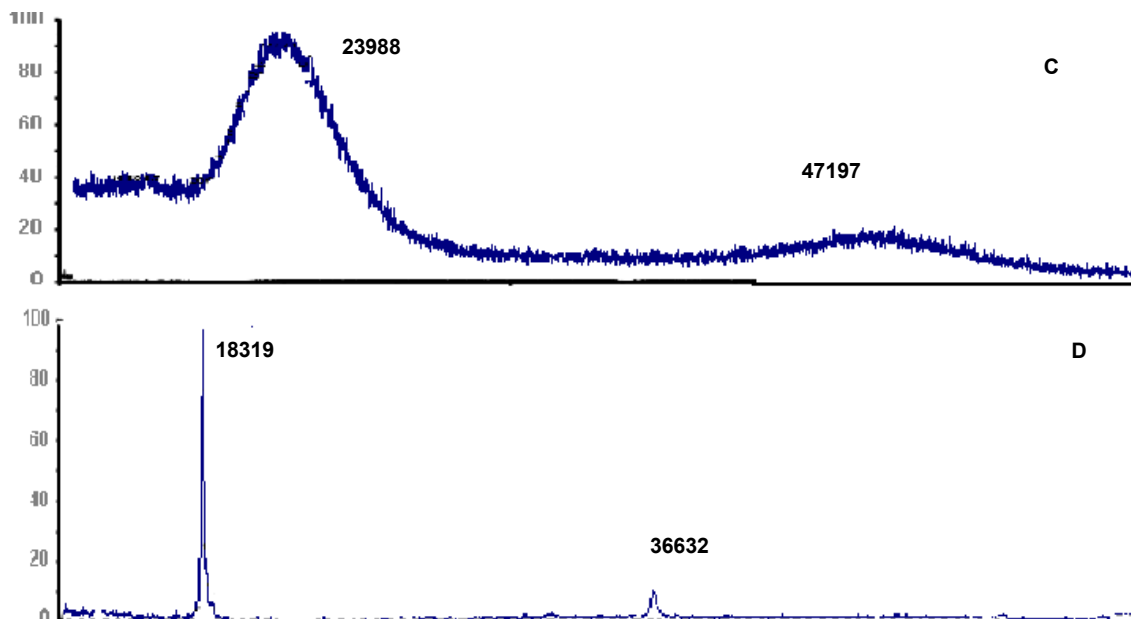


Figure 3.1. MALDI-TOF MS de 10 96 G (A), 10 96 L (B) 10 96 D (C) y *Lg c tt 96h* (D)

Los espectros de masa de β -Lactoglobulina glicosilada con glucosa y lactosa (Figura 3.1 A y B) presentaron una distribución gaussiana con un pico más ancho que la β -Lactoglobulina sin glicosilar (Figura 3.1 D). En el caso de la glicosilación con dextrano (Figura 3.1 C) los espectros se caracterizaron por una distribución gaussiana más ancha que la correspondiente al resto de las muestras analizadas. Este hecho puede ser atribuido a la gran heterogeneidad (Broersen y col., 2004) que deriva de la presencia de dos variantes de β -Lactoglobulina, cada una con 19 sitios susceptibles a la glicosilación (15 Lys, 3 Arg, y el NH₂-terminal), así como a una dispersión en el PM del dextrano utilizado que tiene un valor medio alrededor de 1500. Esta distribución gaussiana de masas por MALDITOF-MS ha sido informada por otros autores (Broersen y col., 2004; Van Teeffelen y col., 2005) los que informaron sobre la existencia de productos heterogéneos con una distribución de Gauss, con un ancho de pico relacionado con el número de carbohidratos unidos.

Los picos de las gaussianas mostraron un máximo de intensidad el cual se puede relacionar con el número medio de carbohidratos unidos por monómero de β -Lactoglobulina. En el caso de glucosa se detectó un aumento significativo en el número de carbohidratos unidos a la proteína al incrementarse la relación molar de 7 a 15 para 51 horas y de 8 a 19 para 96 horas. Cuando los carbohidratos utilizados fueron lactosa y dextrano no se hallaron diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$) en el número de carbohidratos

unidos por monómero de β -Lactoglobulina, tanto en función del tiempo de la reacción o la relación molar. El valor promedio obtenido para la lactosa en las cuatro condiciones ensayadas, fue de 7, mientras que para dextrano fue 4. Este menor número de lactosas glicosiladas en comparación al número de unidades glucosa podría estar relacionado con lo informado por Fogliano y col. (1998), quienes indicaron que de un total de 15 residuos de lisina solo un máximo de 9 residuos presentaron reacción con lactosa.

En el presente trabajo se encontró una relación inversa entre el tamaño molecular del carbohidrato y el número de carbohidratos que reaccionan con la proteína. Morgan y col. (1999a) indicaron que la reacción de glicosilación provoca cambios conformacionales que favorecen entrecruzamientos inter e intramoleculares que impedirían la interacción entre la β -Lactoglobulina y carbohidratos más grandes. Por tanto este hecho permitiría explicar la relación entre el tamaño molecular y número de moléculas reaccionantes de los carbohidratos señalada.

3.2.2.2 *Electroforesis Tricine-SDS-PAGE*

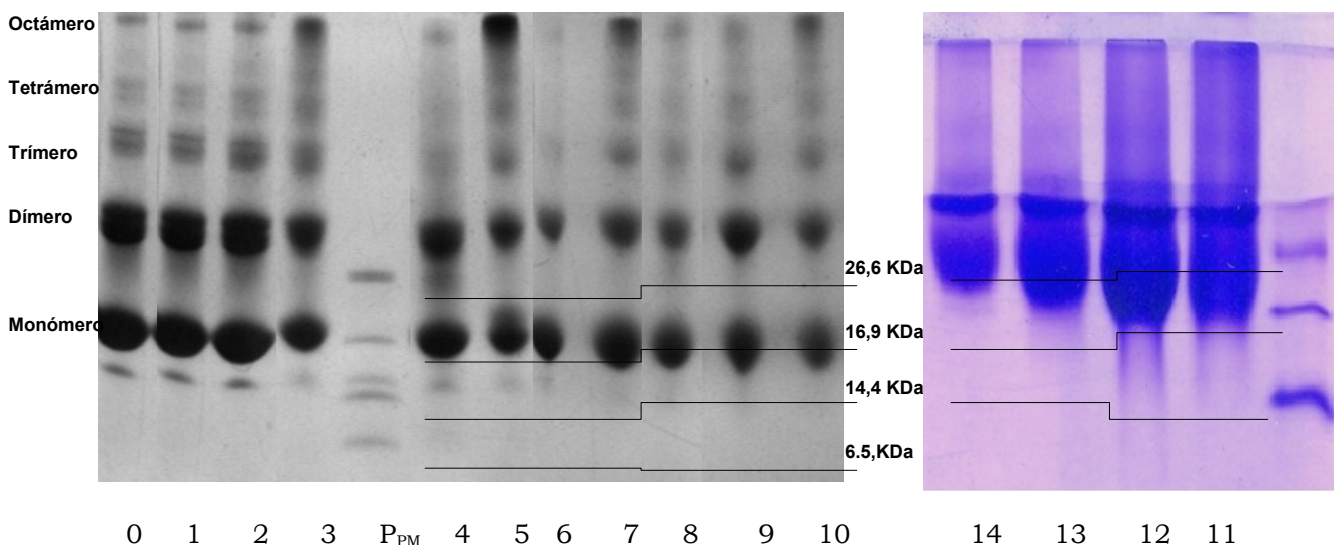


Figura 3.2. Corridas electroforéticas (Tricine-SDS-PAGE) de las siguientes muestras: Lg s tt (0); Lg c tt 51 h (1); Lg c tt 96 h (2); 10 51 G (3), 10 96 G (4), 100 51 G (5); 100 96 G (6); 10 51 L (7); 10 96 L (8); 100 51 L (9) 100 96 L (10); 10 51 D (11); 10 96 D (12); 100 51 D (13); 100 96 D (14) y el patrón de Peso Molecular (P_{PM}).

La separación de proteínas mediante electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida con Tricina-Dodecil Sulfato de Sodio (Tricina-SDS-PAGE) preparados según lo indicado en la sección 2.3.3. Los diagramas electroforéticos obtenidos se presentan en la Figura 3.2. Se pueden observar la presencia de agregados de alto PM que no entraron al gel y una cantidad considerable de agregados solubles correspondientes a octámeros y tetrámeros de la β -Lactoglobulina. Las estructuras que se presentaron en mayor proporción en todas las muestras estudiadas fueron las formas monoméricas y dimericas de β -Lactoglobulina.

Los perfiles electroforéticos obtenidos mostraron también un aumento en el PM de las formas monomérica y dimerica de la β -Lactoglobulina glicosilada respecto a la proteína sin glicosilar, aumento relacionado con el número de carbohidratos unidos a la molécula proteica. Este resultado coincide con el obtenido por MALDI-TOF-MS, aunque en el caso de la electroforesis esta diferencia en el PM no presenta tan buena resolución y precisión como por Espectrometría de Masa. Tanto las bandas electroforéticas, como los picos obtenidos por MALDI-TOF-MS, correspondientes a las muestras glicosiladas con carbohidratos son más anchas respecto a la proteína sin glicosilar aumentando en el siguiente orden glucosa < lactosa < dextrano, lo que puede ser debido a la heterogeneidad de los productos obtenidos.

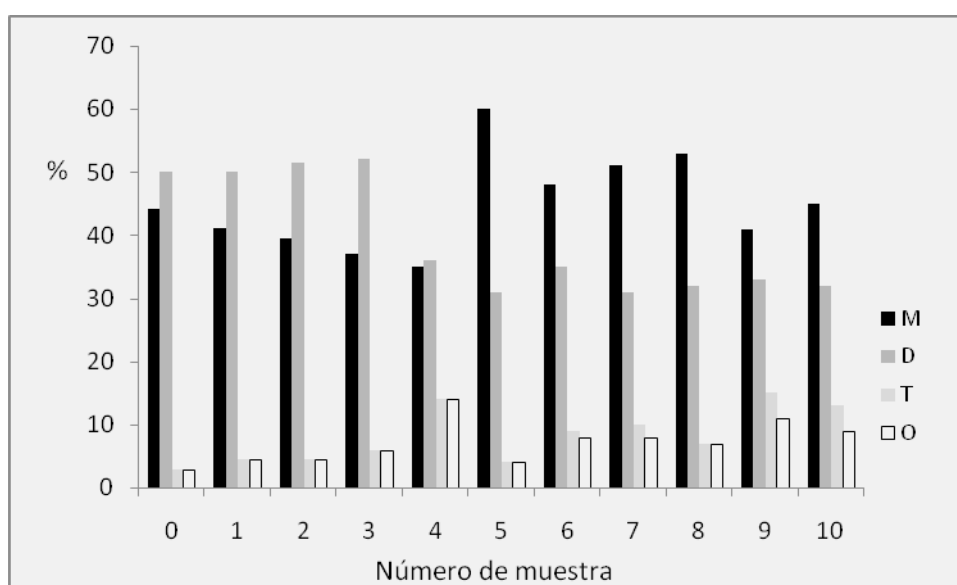


Figure 3.3. Porcentaje de monómeros, dímeros, tetrámeros y octámeros calculados de la corrida electroforética de las diferentes muestras Lg s tt (0); Lg c tt 51 h (1); Lg c tt 96 h (2); 10 51 G (3), 10 96 G (4), 100 51 G (5); 100 96 G (6); 10 51 L (7); 10 96 L (8); 100 51 L (9) 100 96 L (10)

En el caso de las muestras 1:10 51 G y 1:10 96 G se puede apreciar una disminución de las formas dimérica y monomérica de la β -Lactoglobulina con un aumento consecuente de tetrámeros y octámeros. Las muestras 100 51 G, 100 96 G, 10 51 L, 10 96 L, 100 51 L y 100 96 L exhibieron una disminución de la forma dimérica de la β -Lactoglobulina y un aumento de las tres formas restantes.

En las muestras de β -Lactoglobulina glicosiladas con lactosa el porcentaje de octámeros es significativamente mayor ($\alpha \leq 0.05$) que cuando la β -Lactoglobulina es glicosilada con glucosa (Figura 3.3). Cuando la reacción de glicosilación es con dextrano se observa un mayor porcentaje de las formas monoméricas y diméricas de la β -Lactoglobulina respecto a las otras dos formas (Figura 3.2).

3.2.3.- Hidrofobicidad Superficial

El contenido de aminoácidos hidrofóbicos y su ubicación espacial en la proteína ha sido relacionado con las propiedades funcionales (Kato y Nakai, 1980). En una proteína globular, los restos aminoacídicos hidrofóbicos tienden a localizarse en el interior de la proteína, evitando el contacto con el medio acuoso. Sin embargo, debido a impedimentos estéricos, no todos los restos de aminoácidos hidrofóbicos residen en el interior de la molécula proteica. Por tal motivo un número importante de ellos puede permanecer en la superficie de la molécula de la proteína conjuntamente con restos aminoacídicos polares y cargados.

Tabla 3.4
Hidrofobicidad superficial (Ho) en las distintas condiciones ensayadas.

<i>Muestra</i>	<i>Ho</i>	
<i>Lg s tt</i>	37 ± 1	a
<i>Lg c tt 51h</i>	30 ± 3	a,b
<i>Lg c tt 96h</i>	27 ± 3	b
<i>10 51 G</i>	12 ± 4	c
<i>10 96 G</i>	17 ± 4	c
<i>100 51 G</i>	16 ± 4	c
<i>100 96 G</i>	14 ± 4	c
<i>10 51 L</i>	35 ± 1	a
<i>10 96 L</i>	40 ± 5	a
<i>100 51 L</i>	30 ± 5	a,b
<i>100 96 L</i>	38 ± 8	a
<i>10 51 D</i>	15 ± 4	c
<i>10 96 D</i>	13 ± 4	c
<i>100 51 D</i>	10 ± 4	c
<i>100 96 D</i>	10 ± 4	c

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0.05$)

La β -Lactoglobulina glicosilada con glucosa y dextrano presenta valores de H_o menores significativamente ($\alpha \leq 0.05$) que la β -Lactoglobulina sin glicosilar. Esto podría ser debido a un menor número de sitios de unión en la superficie de la proteína con la sonda fluorescente (ANS), lo cual se podría deberse a una posible polimerización por formación de enlaces disulfuro como consecuencia de las reacciones de glicosilación (Morgan y col., 1999a). Según Morgan y col (1999a) la Cys 121 libre de la β -Lactoglobulina se encuentra enterrada en una región hidrofóbica protegida por una α -helice, la cual presenta 3 sitios posibles de reacción de glicosilación ((Lys135, 138, 141). (Figura 3.4)

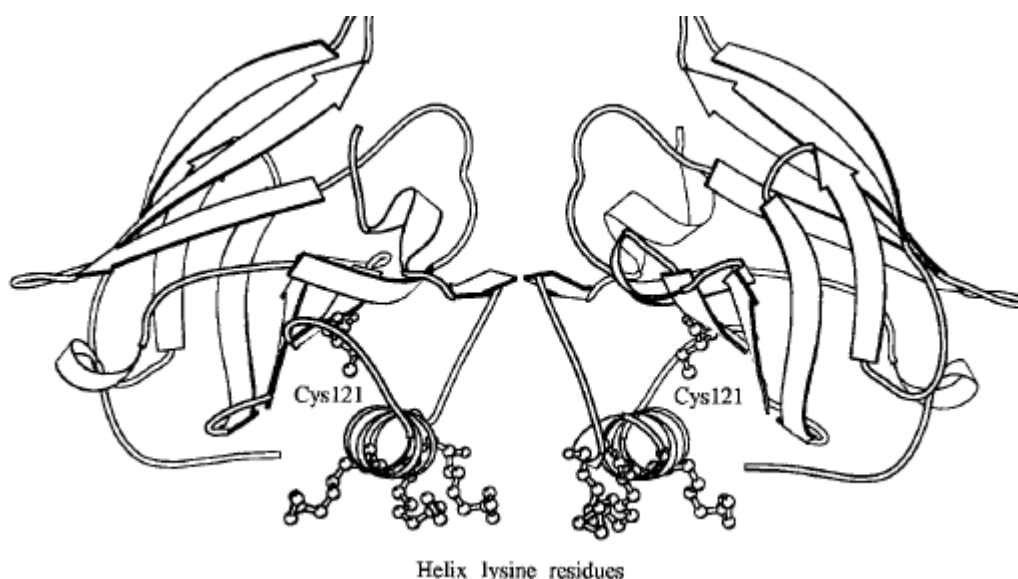
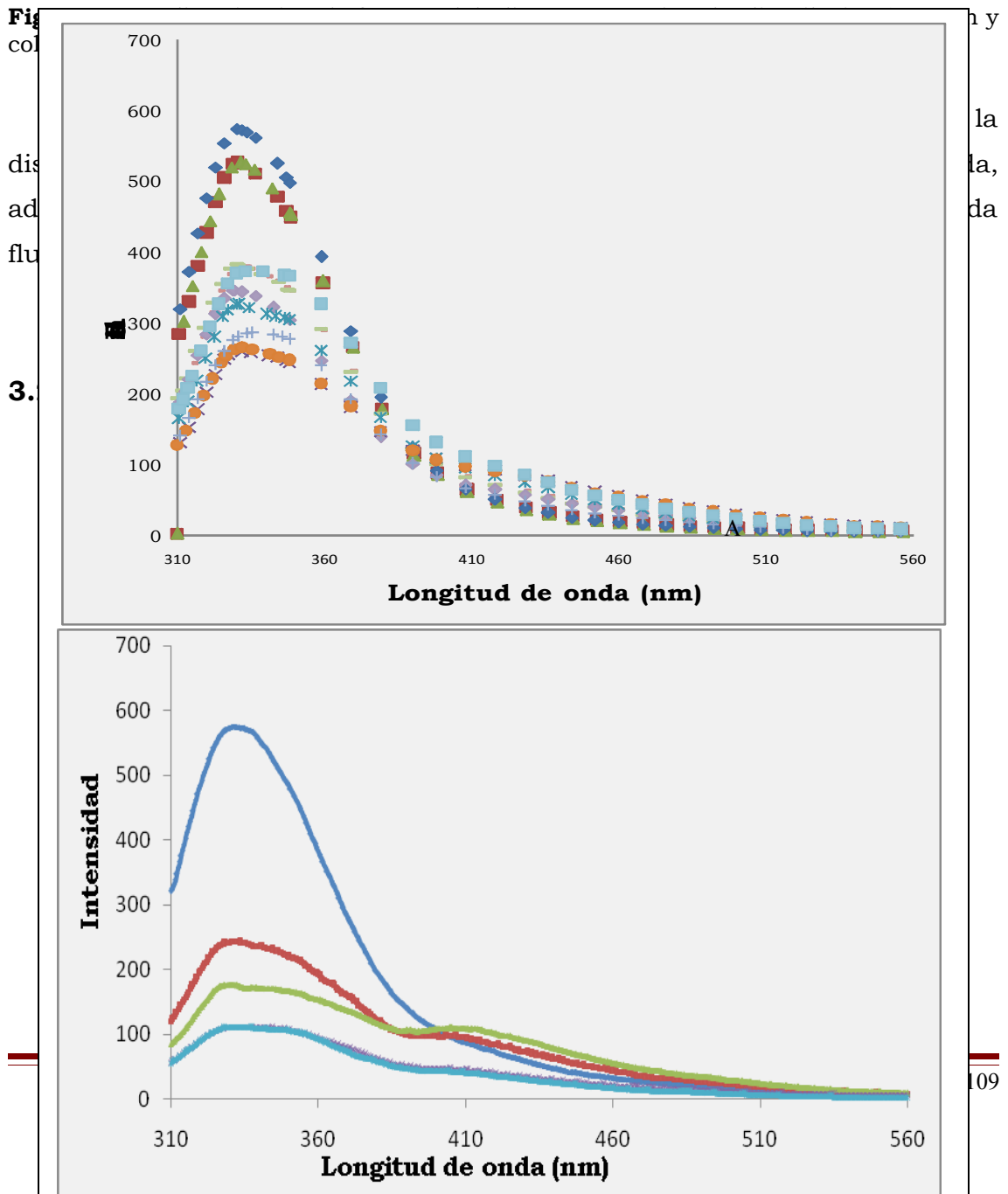
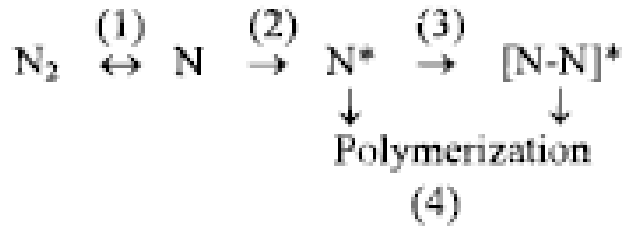


Figure 3.4. Estructura de β -Lactoglobulina indicando el grupo tiol libre (Cys 121) y residuos de lisina (Lys135, 138, 141) presentes en α -helice. Estructura obtenida por MOLSCRIPT (Kraulis, 1991).

Cuando se produce la reacción de glicosilación, a diferencia de cuando se somete la β -Lactoglobulina a tratamientos térmicos en que se produce la disociación del dímero a monómero sin posibilidad de uniones disulfuro, la unión de carbohidratos a las lisinas antes mencionadas provoca una desestabilización de la α -helice, generando un monómero hinchado (N^*) el cual presenta la Cys libre disponible para reacciones de polimerización (Figura3. 5).



B

Figura. 3.6 Espectros de intensidad de fluorescencia en función de la longitud de onda. **A:** Lg s tt (◆); Lg c tt 51 h (◆); Lg c tt 96 h (▲); 10 51 G (*), 10 96 G (+), 100 51 G (●); 100 96 G (×); 10 51 L (-); 10 96 L (-); 100 51 L (■); 100 96 L (◆). **B:** Lg s tt (■); 10 51 D (■); 10 96 D (■); 100 51 D (■); 100 96 D (■)

La intensidad de fluorescencia UV de la β -Lactoglobulina disminuye significativamente con el tratamiento térmico (Figura 3.6-A). Cuando la reacción de glicosilación se realiza con glucosa, lactosa y dextrano se observa una disminución significativa en la intensidad de fluorescencia UV respecto a la β -Lactoglobulina nativa, siendo menor la intensidad de fluorescencia con el aumento del tamaño del carbohidrato. La disminución en la intensidad de fluorescencia podría atribuirse a un ocultamiento de los residuos de aminoácidos aromáticos por una posible agregación de la β -Lactoglobulina glicosilada con los distintos carbohidratos (Figura 3.6 A y B). Estos resultados evidencian que el plegamiento que adquieren los diferentes productos de β -Lactoglobulina glicosilados no es el mismo y podría estar relacionado con el tamaño y el tipo de molécula unida.

Cuando la β -Lactoglobulina es glicosilada con dextrano se detectó un corrimiento de 3-5 nm hacia el rojo del máximo de emisión de fluorescencia, el que podría estar relacionado con un cambio conformacional de la molécula proteica debido a la unión del carbohidrato, el cual provocaría una mayor exposición de residuos Trp. Según Marcia y col. (2004) y Iametti y col. (1996), la reacción de glicosilación de la β -Lactoglobulina expone dos grupos

triptófanos, Trp19 y Trp61 que producen cambios en el espectro de emisión de la molécula.

3.2.5.- Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

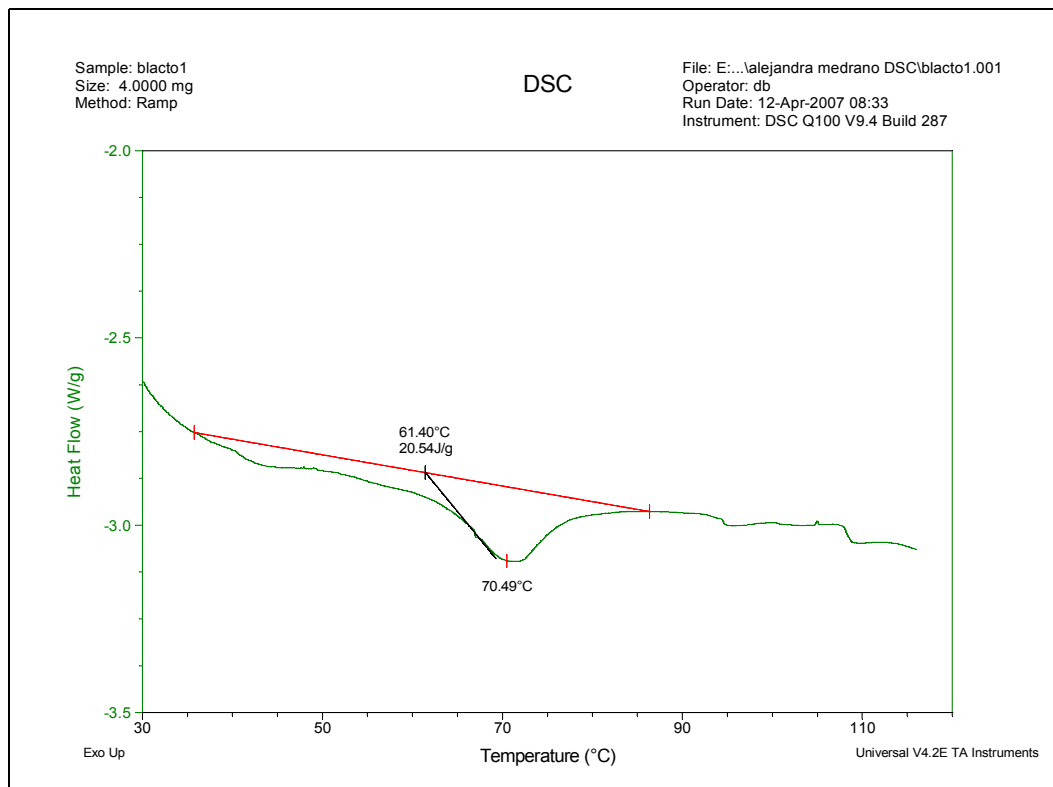


Figura. 3.7 Termograma de β -Lactoglobulina sin tratamiento térmico

El termograma de β -Lactoglobulina obtenido por calorimetría diferencial de barrido presenta dos endotermas alrededor de 40°C y 70°C, respectivamente (Figura 3.7). Estos resultados son concordantes con los informados por Aouzelleg y Bull (2004), Qi y col. (1995).

Qi y col. (1995) atribuyen la existencia de dos endotermas a dos causas:

- al pH de trabajo, 7,5, en el cual la β -Lactoglobulina se encuentra con una conformación dimérica; atribuyéndose en consecuencia la primer endoterma a la disociación del dímero en monómero, y la segunda a la desnaturalización del monómero.

- a la existencia de una distribución de conformaciones a pesar de que todas las moléculas se encuentran en las mismas condiciones fisicoquímicas. De hecho, la mayoría de las proteínas se encontrarán en la conformación que tenga un mínimo de energía libre, pero algunas moléculas se podrían encontrar en un estado energético ligeramente mayor (formas misfolded). Estos estados se encuentran parcialmente desplegados presentando

estructuras nativas y regiones no nativas. En función de ello, se atribuye la existencia de la primer endoterma a las formas "misfolded" que presentarían una estabilidad térmica inferior a la del monómero.

Por su parte Aouzelleg y Bull (2004) atribuyen el termograma obtenido a la existencia en la β -Lactoglobulina de dos dominios los cuales poseerían una estabilidad diferente frente al tratamiento térmico. El primero de ellos poseería un máximo a 65° C y el segundo a 82-83° C.

Tabla 3.5 T_o (Temperatura inicial del pico), ΔH (Entalpía de desnaturalización de la proteína) y T_d (Temperatura de desnaturalización) correspondiente a la desnaturalización del monómero de β -Lactoglobulina de las muestras estudiadas.

<i>Muestra</i>	<i>T_o</i> (°C)	<i>T_d</i> (°C)	<i>ΔH</i> (mJ/mg)
Lg s tt	66± 2 a	74± 2 a	9± 2 a
Lg c tt 51h	64± 1 a	73± 1 a	8± 2 a
Lg c tt 96h	62± 1 a	72± 1 a	8± 2 a
10 51 G	70± 4 a	79± 3 b	9± 1 a
10 96 G	62± 3 a	78± 3 b	3± 1 b
100 51 G	70± 4 a	80 ± 1 c	5± 2 b
100 96 G	63± 2 a	78± 1 b	5± 2 b
10 51 L	68± 3 a	80± 1 b,c	8± 1 a
10 96 L	68± 1 a	82± 1 b,c	9± 1 a
100 51 L	68± 4 a	77± 1 b	6± 1 b
100 96 L	68± 4 a	85± 1 c	5± 1 b
10 51 D	73± 1 b	85 ± 1 b	5 ± 1 b
10 96 D	72± 1 b	85 ± 1 b	6 ± 1 b
100 51 D	73± 4 b	86± 1 b	6 ± 1 b
100 96 D	73± 2 b	86± 1 b	5 ± 1 b

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0.05$)

La temperatura de desnaturalización del monómero (Td) correspondiente a las muestras glicosiladas con los distintos carbohidratos fue significativamente mayor ($\alpha \leq 0.05$) que la correspondiente a la β -Lactoglobulina sin glicosilar. Cuando en la reacción de glicosilación se utilizó lactosa se produjo un aumento significativo ($\alpha \leq 0.05$) de la Td con el tiempo de reacción, hecho no verificado para las muestras glicosiladas con glucosa y dextrano. Se puede observar además que existe una relación directa entre el aumento de la Td y el tamaño del carbohidrato utilizado (Tabla 3.5). Las diferencias detectadas entre las diferentes muestras de β -Lactoglobulina glicosilada con los distintos carbohidratos utilizados, se puede relacionar con el diferente plegamiento obtenido. Según Jiménez-Castaño y col. (2005) cuando en la reacción de glicosilación se utilizan dextranos se produce una polimerización de la β -Lactoglobulina mediante la formación de puentes disulfuro, generándose además complejos de alto PM formados por enlaces covalentes entre β -Lactoglobulina-dextrano.

La entalpia de desnaturalización de las muestras glicosiladas fue, en todos los casos, significativamente menor ($\alpha \leq 0.05$) que la correspondiente a la muestra sin glicosilar. Cuando la reacción de glicosilación se realizó con glucosa y lactosa la entalpia de desnaturalización disminuyó de manera significativa ($\alpha \leq 0.05$) con la relación molar, comportamiento no verificado para las muestras glicosiladas con dextrano (Tabla 3.5).

Las diferencias obtenidas entre las muestras sin glicosilar y las glicosiladas serían consecuencia del cambio conformacional de la β -Lactoglobulina provocado por los distintos carbohidratos utilizados. Tal como se indicó previamente, Aouzelleg y Bull (2004) la disminución de la entalpía de desnaturalización térmica de la β -Lactoglobulina tratada con dextrano respecto a la de la proteína sin glicosilar se debería a la interacción que se produce entre los polisacáridos y las proteínas.

3.3. Grado de avance de la reacción de glicosilación

3.3.1.- Determinación de furosina

Tabla 3.6 Contenido de furosina en las muestras originales y glicosiladas

<i>Muestras</i>	<i>Furosina (mg/100 g β-Lg)</i>
<i>Lg s tt</i>	0,0
<i>Lg c tt 51h</i>	0,0
<i>Lg c tt 96h</i>	0,0
<i>10 51 G</i>	5,4±0,2 d
<i>10 96 G</i>	6,2±0,2 e
<i>100 51 G</i>	4,6±0,2 c
<i>100 96 G</i>	4,2±0,2 c
<i>10 51 L</i>	3,0±0,2 b
<i>10 96 L</i>	3,4±0,2 b
<i>100 51 L</i>	3,2±0,2 b
<i>100 96 L</i>	3,6±0,2 b
<i>10 51 D</i>	1,9±0,2 a
<i>10 96 D</i>	2,0±0,1 a
<i>100 51 D</i>	3,8±0,2 b,c
<i>100 96 D</i>	4,3±0,2 c

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha < 0.05$)

Otra forma de evaluar el avance de la reacción de glicosilación es mediante la determinación de furosina, producto de hidrólisis del compuesto de Amadori (lactulosil-lisina) que se forma en las primeras etapas de la reacción de Maillard entre lactosa y lisina.

Para cada carbohidrato utilizado se encontró un comportamiento diferente. En el caso de dextrano el contenido de furosina aumenta con el tiempo de reacción y con la relación molar mientras que con lactosa no se observaron diferencias significativas entre las muestras. En el caso de glucosa el contenido de furosina aumenta con el tiempo de reacción y con la relación molar.

En el caso de lactosa no se observaron diferencias significativas entre las muestras. En el caso de glucosa el contenido de furosina aumenta con el tiempo de reacción y con la relación molar.

3.3.2.

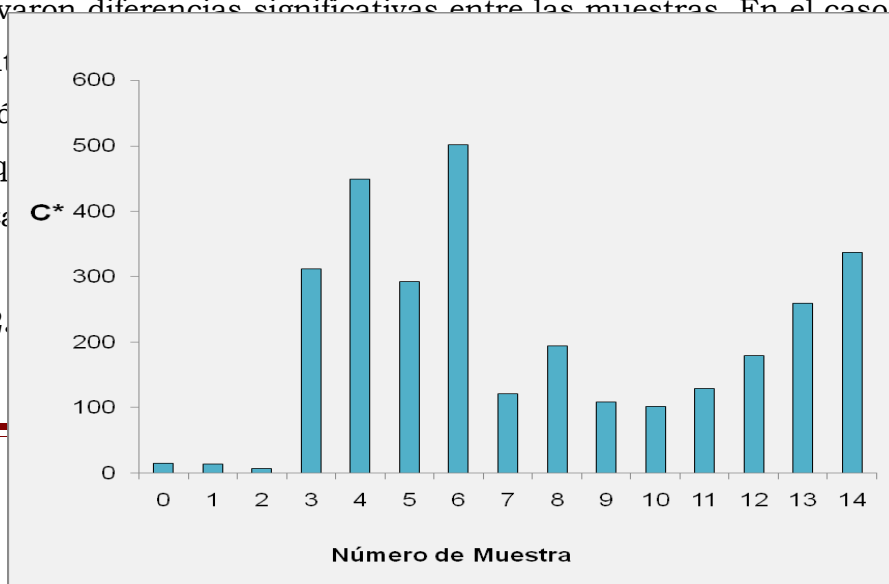


Figura 3.8. Parámetro de Color Cromo (C*) de las siguientes muestras: Lg s tt (0); Lg c tt 51 h (1); Lg c tt 96 h (2); 10 51 G (3), 10 96 G (4), 100 51 G (5); 100 96 G (6); 10 51 L (7); 10 96 L (8); 100 51 L (9); 100 96 L (10); 10 51 D (11); 10 96 D (12); 100 51 D (13); 100 96 D (14)

Para evaluar el color se determinan los parámetros H* y C*

$$H^* = \operatorname{tg}\left(\frac{b}{a}\right) \quad \text{si } a \geq 0 \quad \text{o} \quad H^* = 180 - \operatorname{tg}\left(\frac{b}{a}\right) \quad \text{si } a \leq 0 \text{ y } b \geq 0$$

$$C^* = \sqrt{(a^2 + b^2)}$$

Los resultados obtenidos, Figura 3.8, muestran la existencia de un aumento significativo ($\alpha \leq 0.05$) de intensidad del croma., C*, con la reacción de glicosilación independientemente del hidrato de carbono utilizado. Los compuestos glicosilados con glucosa presentaron un mayor corrimiento hacia el rojo (a) y amarillo (b) que aquellos obtenidos por glicosilación de β -Lactoglobulina con lactosa. Las muestras glicosiladas con glucosa mostraron además una mayor formación de compuestos coloreados al incrementarse el tiempo de reacción Mientras que en el caso de las muestras glicosiladas con dextrano el color aumenta con el tiempo de reacción y con la relación molar (Figura 3.8).

Los resultados del parámetro C* concuerdan con la percepción sensorial del color dado que las muestras de β -Lactoglobulina glicosilada con glucosa presentaron una mayor coloración que los compuestos glicosilados obtenidos con lactosa y dextrano, y con el contenido de furosina ya que las muestras de β -Lactoglobulina glicosiladas con glucosa presentaron una disminución del contenido de furosina debido a la existencia simultanea de reacciones que

consumen este compuesto para dar lugar a los productos más avanzados de la reacción de Maillard.

Resumen y conclusiones parciales

Este Capítulo se ha dedicado al estudio de los cambios fisicoquímicos y estructurales sufridos por la β -Lactoglobulina cuando es glicosilada con glucosa, lactosa y dextrano. Con el fin de comprender dichos cambios el tema ha sido abordado desde diferentes ángulos lo que ha permitido obtener una serie de resultados que se complementan entre sí. Los conocimientos alcanzados en esta parte del trabajo proporcionan la información requerida para comprender el comportamiento de la β -Lactoglobulina glicosilada y no glicosilada en sistemas coloidales como emulsiones y espumas.

A continuación se describen de manera resumida las conclusiones parciales extraídas del presente estudio.

- ✓ Existen diferencias significativas en la reacción de glicosilación con los distintos carbohidratos ensayados según el número de monómeros unidos a la molécula de proteína. En el caso de glucosa se detectó un aumento significativo con la relación molar del número de residuos de azúcar unidos por proteína, el cual varió de 7 a 15 y de 8 a 19 para 51 y 96 horas de reacción respectivamente. Este comportamiento no fue observado para las muestras de β -Lactoglobulina glicosiladas con lactosa y dextrano; el número de carbohidratos unidos no varió ni con el tiempo de reacción ni con la relación molar proteína: carbohidrato. El valor promedio obtenido para lactosa en las cuatro condiciones ensayadas fue 7 y 4 para dextrano.

- ✓ La reacción de glicosilación no enzimática provocaría una desnaturalización parcial de la β -Lactoglobulina y aumento de PM provocado por la unión de los carbohidratos, no afectando significativamente la solubilidad de los productos obtenidos en las condiciones ensayadas.

✓ Luego de la unión de los carbohidratos se produce una disminución significativa en la hidrofobicidad aromática superficial y en la intensidad de fluorescencia en el UV, lo cual se puede atribuir a posibles reacciones de agregación, por formación de enlaces disulfuro y a la formación de enlaces entre monómeros de β -Lactoglobulina glicosilada por los distintos carbohidratos. En el caso de la glicosilación con dextrano la disminución de la hidrofobicidad superficial y la intensidad de fluorescencia en el UV de los compuestos glicosilados es superior a la del resto de compuestos glicosilados con lactosa y glucosa, debido probablemente a la existencia de impedimentos estéricos que reducirían la capacidad de la sonda fluorescente para unirse a los residuos aminoacídicos de naturaleza no polar.

✓ Se encontraron diferencias significativas en los termogramas correspondientes a las muestras glicosiladas con los distintos carbohidratos. En todos los casos se detectó un corrimiento de la (Td) del monómero de β -Lactoglobulina hacia mayores temperaturas, corrimiento que es mayor cuanto mayor es el tamaño molecular del carbohidrato empleado en la glicosilación. En cuanto a la entalpía de desnaturalización esta es menor en el caso de los compuestos glicosilados que para la proteína sin glicosilar.

✓ La determinación del grado de avance de la reacción de glicosilación se realizó mediante la determinación del contenido de furosina y por medidas de color de los productos finales de reacción. En el caso de la glicosilación con glucosa, los productos intermedios disminuyen con el tiempo de reacción favoreciéndose la formación de los productos finales con mayores valores de C*. En el caso de las muestras glicosiladas con dextrano el contenido de furosina y el valor del cromógeno, C*, aumentan con el tiempo de reacción y con la relación molar utilizada. Por otra parte no se encontraron diferencias significativas en el parámetro C* ni en el contenido de furosina correspondientes a las muestras glicosiladas con lactosa.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades Espumantes

4.- PROPIEDADES ESPUMANTES

4.1.- Determinación de tensión superficial (agua/aire)

Para seguir el proceso de modificación de la tensión superficial con el tiempo se obtuvieron datos con el tensiómetro de volumen de gota Lauda TVT2 y con el tensiómetro dinámico de gota (Tracker, IT-Concept, Saint-Clementtes Places, France). A partir de ellos y haciendo uso del modelo cinético propuesto por Panizzolo (2005) se obtuvieron las constantes de velocidad para los procesos de adsorción y reordenamiento. La ecuación empleada fue:

$$\gamma_t = A_a e^{-k_a t} + A_r e^{-k_r t} + \gamma_e \quad (2.9)$$

donde:

k_a y k_r : son constantes de velocidad de primer orden para los procesos de adsorción y reordenamiento de las proteínas en la interfase aire-agua respectivamente

A_a , A_r : son los parámetros de amplitud.

γ_e : tensión superficial de equilibrio

Tabla 4.1: Constante de velocidad de adsorción (k_a), constante de velocidad de reordenamiento (k_r) y tensión superficial de equilibrio (γ_e) para las distintas muestras.

Muestra	K_a (s^{-1})	$K_r \cdot 10^{-3}$ (s^{-1})	γ_e (mN/m)
<i>Lg s tt</i>	0,09 ± 0,01 a	0,002 ± 0,002 a	57,9 ± 0,4 a
<i>Lg c tt 51h</i>	0,08 ± 0,01 b	0,003 ± 0,002 a	58,6 ± 0,5 a
<i>Lg c tt 96h</i>	0,07 ± 0,01 c	0,001 ± 0,002 a	57,1 ± 0,4 a
<i>.10 51 G</i>	0,08 ± 0,01 b	0,001 ± 0,002 a	57,7 ± 0,4 a
<i>.10 96 G</i>	0,08 ± 0,01 b	0,002 ± 0,002 a	57,7 ± 0,4 a
<i>.100 51 G</i>	0,07 ± 0,01 c	0,001 ± 0,002 a	57,1 ± 0,4 a
<i>.100 96 G</i>	0,08 ± 0,01 b	0,003 ± 0,002 a	58,8 ± 0,4 a
<i>.10 51 L</i>	0,06 ± 0,01 c	0,001 ± 0,002 a	58,2 ± 0,4 a
<i>.10 96 L</i>	0,07 ± 0,01 c	0,002 ± 0,002 a	59,2 ± 0,4 a
<i>.100 51 L</i>	0,07 ± 0,01 c	0,002 ± 0,002 a	59,1 ± 0,4 a
<i>.100 96L</i>	0,07 ± 0,01 c	0,002 ± 0,002 a	58,9 ± 0,4 a
<i>.10 51 D</i>	0,07 ± 0,01 c	0,002 ± 0,002 a	57,8 ± 0,4 a
<i>.10 96 D</i>	0,05 ± 0,01 d	0,002 ± 0,002 a	58,4 ± 0,5 a
<i>.100 51 D</i>	0,05 ± 0,01 d	0,002 ± 0,002 a	58,2 ± 0,4 a
<i>.100 96 D</i>	0,06 ± 0,01 c	0,002 ± 0,002 a	58,6 ± 0,3 a

Tensiómetro dinámico de gota, Tracker. Concentración de muestra: 1 mg/mL en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,5. Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0.05$)

Tabla 4.2: Constante de velocidad de adsorción (k_a), constante de velocidad de reordenamiento (k_r) y tensión superficial de equilibrio (γ_e) para las distintas muestras.

Muestra	K_a (s^{-1})	$K_r \cdot 10^{-3}$ (s^{-1})	γ_e (mN/m)
Lg s tt	0,30±0.06 a	0,001±0.001 a	49±4 a
Lg c tt 51h	0,28± 0.01 b	0,004±0.001 a	48±1 a
Lg c tt 96h	0,21± 0.02 c	0,002±0.002 a	47±2 a
.10 51 G	0,29±0.06 a,b	0,002±0.002 a	50±3 a
.10 96 G	0,24±0.06 c	0,006±0.004 a	49±4 a
.100 51 G	0,21±0.06 c	0,003±0.002 a	50±4 a
.100 96 G	0,24±0.01 c	0,005±0.004 a	49±2 a
.10 51 L	0,30±0.06 a	0,002±0.002 a	46±6 a
.10 96 L	0,25± 0.03 b,c	0,004±0.001 a	51±3 a
.100 51 L	0,24±0.06 c	0,004±0.002 a	51±4 a
.100 96L	0,27± 0.07 b	0,003±0.002 a	49±4 a
.10 51 D	0,25± 0.03 b,c	0,005±0.005 a	49±4 a
.10 96 D	0,24±0.06 c	0,002±0.002 a	50±4 a
.100 51 D	0,25± 0.03 b,c	0,004±0.001 a	49±2 a
.100 96 D	0,24±0.06 c	0,004±0.002 a	50±4 a

Tensiómetro de volumen de gota Lauda TVT2 Concentración de muestra: 1 mg/mL en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,5. Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0.05$)

Los resultados obtenidos con uno y otro tensiómetro presentaron una tendencia similar. El valor de tensión superficial en equilibrio (γ_e) del agua, sin agregado de proteínas, fue 72mN/m a temperatura ambiente y disminuyó debido a la presencia de proteínas. Según Tornberg y col. (1982), la velocidad de disminución de la tensión superficial debido a las proteínas puede ser evaluada a través de tres etapas consecutivas: 1) la difusión de las moléculas proteicas, 2) la adsorción a la interfase y 3) el desplegamiento de las moléculas ya adsorbidas. Por esto es apropiado analizar no solo la tensión superficial de equilibrio sino también la velocidad de adsorción y el reordenamiento de las proteínas en la interfase.

Los resultados de tensión superficial de equilibrio correspondientes a la β -Lactoglobulina no sometida a tratamiento térmico y la β -Lactoglobulina glicosilada con glucosa, lactosa y dextrano no presentaron diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$) entre sí. Tampoco presentaron diferencias significativas los valores de la constante de velocidad para el proceso de reordenamiento (k_r) con el tratamiento térmico, los carbohidratos utilizados, el tiempo de reacción, o las diferentes relaciones molares utilizadas (Tabla 4.1 y 4.2).

En todos los sistemas estudiados se encontró una disminución significativa ($\alpha \leq 0.05$) de la constante de velocidad para el proceso de adsorción

(ka) con el aumento del tiempo de calentamiento de β -Lactoglobulina. Esta disminución del valor de ka indicaría que el proceso de adsorción de la β -Lactoglobulina sometida a tratamiento térmico por 96 h fue más lento que el correspondiente a β -Lactoglobulina sometida a un tratamiento térmico de 51 h y este a su vez más lento que el de la β -Lactoglobulina sin tratamiento térmico. Esta disminución de la adsorción estaría relacionada con los cambios estructurales sufridos por la proteína por efectos de la temperatura, discutidos en el capítulo anterior. Las nuevas configuraciones adoptadas por la β -Lactoglobulina provocarían un mayor impedimento en el momento de la adsorción en la interfase. Este resultado coincide con lo informado por Damodaran (2005), quien indicó que el tratamiento térmico de la β -Lactoglobulina provoca una disminución en la hidrofobicidad superficial y la agregación de las proteínas por desnaturalización, influyendo en la formación de la película de proteínas en la interfase.

En lo referente a las proteínas glicosiladas, se encontró una disminución significativa de la constante de velocidad de adsorción entre muestras con diferentes grados de glicosilación con glucosa, lactosa y dextrano y la β -Lactoglobulina sin glicosilar, salvo en el caso de las muestras 10 51 L y 10 51 G, que no presentaron diferencias significativas en los valores de esta constante con respecto a la β -Lactoglobulina sin glicosilar. Estas muestras fueron las que presentaron un menor grado de glicosilación y un menor número de grupos carbohidratos unidos a la molécula proteica, según los resultados obtenidos por MALDI-TOF. Las propiedades fisicoquímico-estructurales presentaron menores diferencias con las muestras de β -Lactoglobulina nativa, por lo que su comportamiento en la interfase aire-agua también fue similar.

La disminución encontrada en la velocidad de adsorción de β -Lactoglobulina glicosilada con los tres carbohidratos utilizados en este estudio estaría relacionada con:

- la disminución en la hidrofobicidad superficial detectada, dado que la cantidad de zonas hidrofóbicas en la superficie de la molécula de la proteína está directamente relacionada con la fase de penetración durante la adsorción (Sección 3.2.3)

- la formación de estructuras poliméricas, ya indicadas en la sección 3.2.2.2 (Figura 3.3), relacionadas con la formación de enlaces disulfuro o enlaces covalentes entre β -Lactoglobulina y los carbohidratos lo que

provocaría un mayor impedimento en el momento de la adsorción de la proteína en la interfase (Morgan y col. 1999a)

4.2.- Comportamiento superficial dinámico

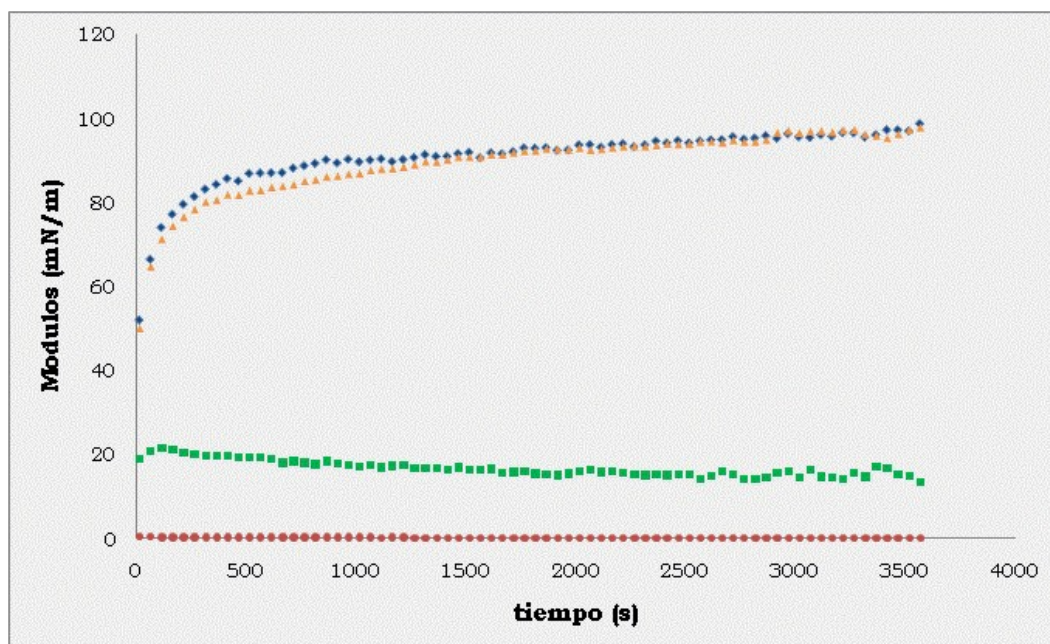


Figura 4.1. Módulo total (◆), Módulo de viscosidad dilatacional superficial (■), Módulo de elasticidad dilatacional superficial (▲) y tangente del ángulo de pérdida (●) en función del tiempo de Lg s tt

Según el análisis estadístico realizado, la viscosidad dilatacional superficial (η_d) y la tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \varphi$) de todas las muestras de β -Lactoglobulina nativas y glicosiladas con los distintos carbohidratos, mostraron un comportamiento independiente del tiempo de análisis. En cambio, es evidente un aumento significativo de la componente elástica (ϵ_d), la cual presentó el mismo perfil con la variación del tiempo que el módulo total (E). A modo de ejemplo se muestra el comportamiento superficial dinámico de la β -Lactoglobulina nativa (Figura 4.1).

La tangente del ángulo de pérdida presenta un valor comprendido entre 0,10 y 0,22 lo que indica que la película formada en la interfase por los diferentes compuestos glicosilados y no glicosilados analizados tiene un comportamiento puramente elástico (Tabla 4.3). Este comportamiento está regulado por las condiciones de frecuencia utilizadas en el ensayo experimental, el cual en este caso fue de 100mHz, (Benjamins y col. (1996); Freer y col. (2004)). Según estos autores el valor de ($\text{tg } \varphi$) está relacionado con

el comportamiento complementario entre el módulo elástico y el módulo viscoso, ϵ_d aumenta conforme aumenta la frecuencia de oscilación mientras que η_d disminuye al aumentar la frecuencia. A frecuencias bajas la proteína tiene tiempo suficiente para responder a la variación de área, produciendo fenómenos de relajación en la capa superficial, de esta forma el comportamiento viscoso se hace notorio. Por el contrario, un aumento de la frecuencia de la oscilación disminuye el tiempo que tiene la proteína interfacial para adaptarse a la deformación, así el comportamiento elástico de la capa superficial aumenta en detrimento de su comportamiento viscoso. Finalmente, a frecuencias suficientemente altas, la viscosidad de la capa superficial se hace despreciable, y, por encima de una frecuencia de 100mHz, se considera que la capa superficial presenta un comportamiento puramente elástico.

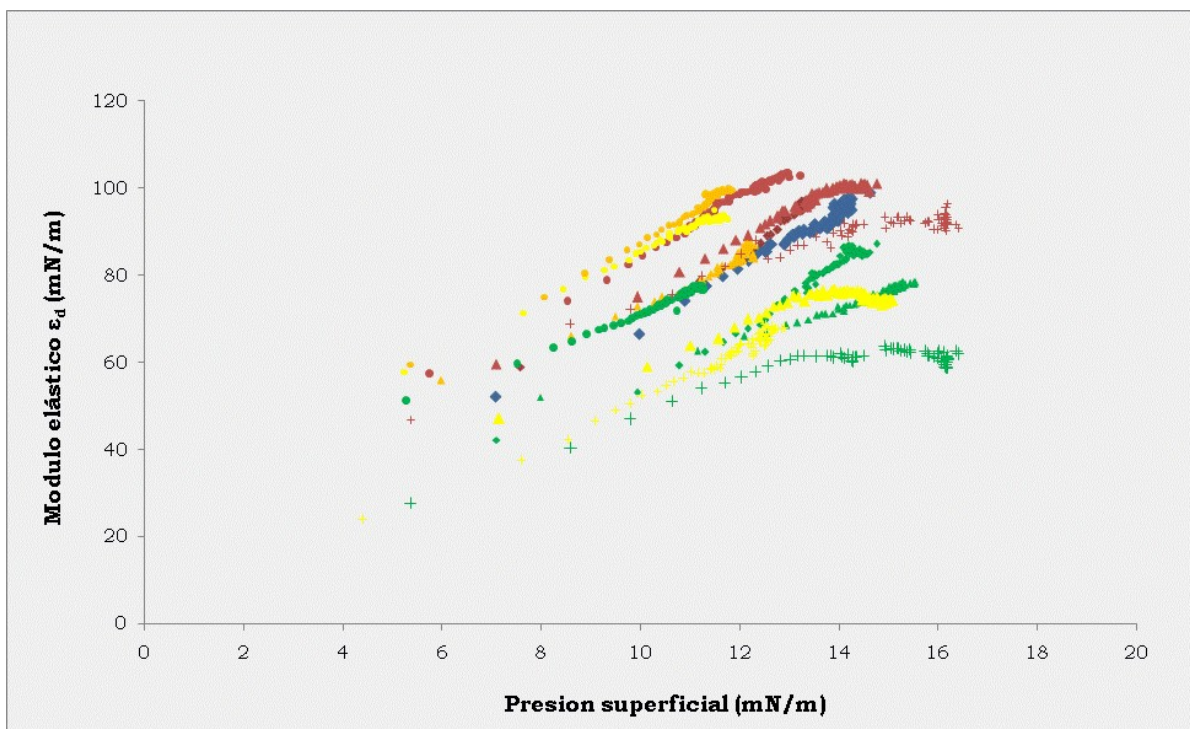


Figura 4.2 Módulo elástico en función de la presión Superficial β -Lg s tt (\blacklozenge), β -Lg c tt 51 (\blacklozenge), β -Lg c tt 96h (\blacklozenge), 1:10 51 G (\blacktriangle), 1:10 96 G (\blacktriangle), 1:100 51 G (\blacktriangle), 1:100 96 G (\blacktriangle), 1:10 51 L (\bullet), 1:10 96 L (\bullet), 1:100 51 L (\bullet), 1:100 96 L (\bullet), 1:10 51 D ($+$), 1:10 96 D ($+$), 1:100 51 D ($+$), 1:100 96 D ($+$).

Si se grafica el módulo elástico en función de la presión se ve un aumento hasta llegar a un máximo (Figura 4.2). Este máximo en la elasticidad esta ligado a cambios conformacionales de la capa superficial (Benjamins y Lucassen-Reynders, 1998; Cicuta y Hopkinson, 2001; Mellema y col., 1998). Estos autores en estudios realizados a diferentes frecuencias (10 mHz a 200 mHz) encontraron que la capa superficial formada experimentaba transformaciones estructurales diferentes en función del tiempo del que

dispone la película superficial para responder al cambio en área. A bajas frecuencias encontraron dos máximos, relacionados con un colapso de segmentos en la subfase y con la formación de bucles. Cuando trabajaron a frecuencias similares a las utilizadas en esta tesis, encontraron solo un pico relacionado con una transición conformacional de la proteína en la interfase aire-agua. Estos autores atribuyen la transición conformacional encontrada a la formación de una bicapa en la interfase. A este valor de la presión superficial el recubrimiento superficial es suficiente alto como para que la proteína se absorba formando dos capas consecutivas de proteínas. Dado que las proteínas sin glicosilar (Lg s tt; Lg c tt 51 h y Lg c tt 96 h) presentaron el máximo a presiones más altas o su máximo no apareció en las condiciones utilizadas, quedaría indicado que es necesario un mayor recubrimiento superficial para que se produzca la transición conformacional en comparación con las proteínas glicosiladas con carbohidratos. Este cambio se debe a que la película es más gruesa por la glicosilación de la β -Lactoglobulina por los distintos carbohidratos y que a mayor tamaño del carbohidrato, más gruesa es la película debido a una mayor hidratación.

Tabla 4.3: Pendiente del modulo elástico ($P_{\epsilon d}$), altura del máximo módulo elástico ($Max \epsilon d$) y tangente del ángulo de pérdida ($tg \varphi$) para las muestras.

Muestra	$P_{\epsilon d}$	$Max \epsilon d$ (mN/m)	$tg \varphi$
---------	------------------	----------------------------	--------------

Lg s tt	6,3 ± 0,3 a	98 ± 3 a	0,15 ± 0,04a
Lg c tt 51h	7,0 ± 0,3 a	96 ± 2 a	0,10 ± 0,04a
Lg c tt 96h	7,1 ± 0,3 a	89 ± 2 b	0,11 ± 0,04a
10 51 G	6,1 ± 0,3 a	101 ± 3 a	0,14 ± 0,06a
10 96 G	3,4 ± 0,3 b	80 ± 2 c	0,22 ± 0,06a
100 51 G	4,6 ± 0,3 b	80 ± 3 c	0,21 ± 0,05a
100 96 G	4,7 ± 0,3 b	87 ± 3 b	0,16 ± 0,06a
10 51 L	6,8 ± 0,3 a	102 ± 3 a	0,15 ± 0,05a
10 96 L	4,3 ± 0,3 b	78 ± 2 c	0,12 ± 0,04a
100 51 L	5,8 ± 0,3 a,b	96 ± 2 a	0,10 ± 0,04a
100 96L	5,2 ± 0,3 b	99 ± 2 a	0,13 ± 0,04a
10 51 D	4,4 ± 0,3 b	93 ± 2 a,b	0,22 ± 0,04a
10 96 D	4,2 ± 0,3 b	62 ± 2 d	0,21 ± 0,06a
100 51 D	5,1 ± 0,3 b	66 ± 3 d	0,20 ± 0,05a
100 96 D	2,7 ± 0,3 c	60 ± 4 d	0,20 ± 0,06a

Concentración de muestra: 1 mg/mL en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,5.
Frecuencia de la oscilación: 100mHz. Amplitud de la oscilación: 10%. Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0,05$)

Con el fin de conocer la estructura interfacial de la proteína en cada región de la curva módulo elástico vs. presión superficial (Figura 4.2) se evaluaron la pendiente de la parte lineal creciente del máximo y la altura del mismo. Según Benjamins y col. (1996) y Benjamins y Lucassen-Reynders (1998) la pendiente correspondiente a esta región de la curva es indicativa del grado de compactación de las moléculas en la interfase, la pendiente aumenta conforme disminuye la flexibilidad de la proteína. En la Tabla 4.3 se presentan los valores de la pendiente del módulo elástico (P_{ed}) de la β -Lactoglobulina sometida o no al tratamiento térmico. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) con el aumento del tiempo de la reacción. Las muestras de β -Lactoglobulina glicosiladas con glucosa, lactosa y dextrano presentaron en la mayoría de los casos valores de P_{ed} significativamente menores que los correspondientes a la β -Lactoglobulina no glicosilada ($\alpha \leq 0,05$) (Tabla 4.3). Teniendo en cuenta que la reacción de glicosilación no enzimática entre la β -Lactoglobulina y los carbohidratos utilizados en este estudio provoca, como ha sido mostrado previamente, un cambio conformacional en la proteína que incide en los valores de hidrofobicidad superficial, fluorescencia en el UV y calorimetría diferencial de barrido, la disminución de P_{ed} se correspondería con una mayor flexibilidad molecular de los compuestos glicosilados, flexibilidad que se relaciona directamente con el área molecular superficial.

Las soluciones proteicas correspondientes a Lg s tt, Lg c tt 96h, 1 10 51 L, 1 100 51 L y 1 100 96 L, no mostraron la existencia de máximos en las condiciones de ensayo utilizadas, por lo que el valor que se incluyó en la

Tabla 4.3 es el que corresponde al valor más alto del módulo elástico obtenido. Según lo expresado anteriormente las soluciones elaboradas con estas proteínas no llegan en las condiciones de estudio a formar una bicapa en la interfase, como ya fuera explicado para la β -Lactoglobulina sin glicosilar. En el caso de las muestras de β -Lactoglobulina glicosiladas con lactosa este resultado no se correlaciona con los cambios estructurales encontrados.

Las muestras de β -Lactoglobulina glicosiladas con dextrano presentaron valores del máximo significativamente menores que el de las otras muestras, lo cual se podría atribuir a la formación de una película interfacial más gruesa debido a una mayor hidratación de la misma.

4.3 Espumas de β -lactoglobulina

Las espumas se obtuvieron haciendo uso del método de burbujeo el cual permite analizar el proceso de formación y desestabilización de las espumas a través de medidas conductimétricas (Loisel y col., 1993). Los datos colectados (Conductividad en función del tiempo) fueron graficados para analizar la formación y la estabilidad de la espuma (Figura 4.3).

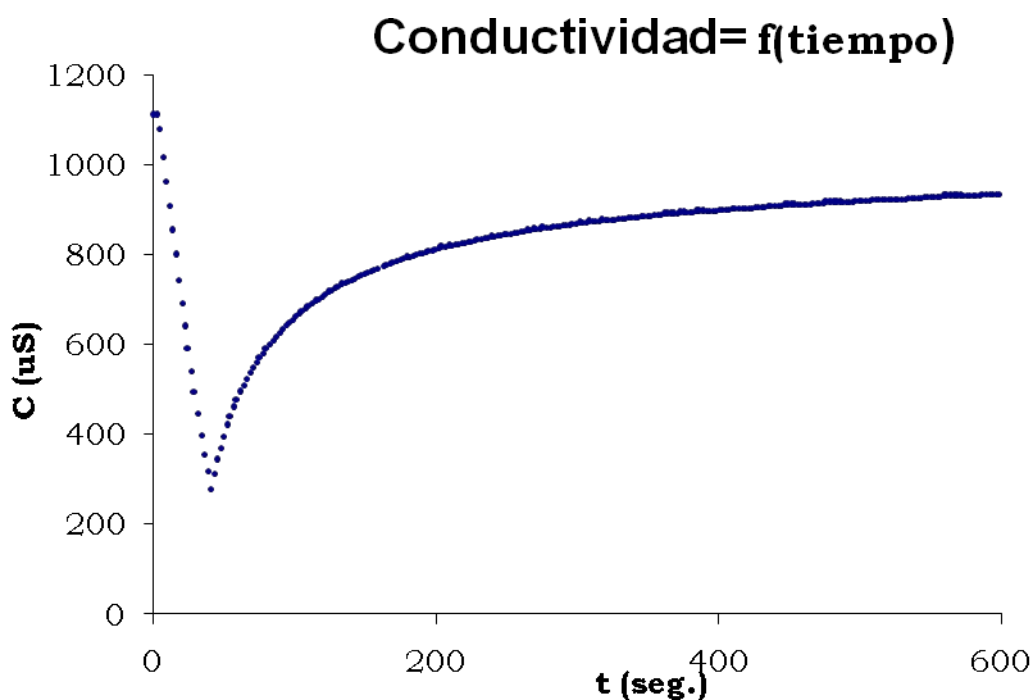


Figura 4.3 Conductividad en función del tiempo para una espuma elaborada con β -lactoglobulina:dextrano relación 1:100 96 h, [proteína] = 1 mg/mL, pH 7,5.

4.3.1 Formación de espumas

El estudio de la formación de espuma se abordó desde dos puntos de vista, uno cuantitativo, considerando dos parámetros vinculados a la formación de espuma: volumen máximo de líquido retenido en la espuma (V_{LEmax}) y la velocidad inicial de pasaje del líquido a la espuma (V_i), y otro cualitativo: tamaño de las burbujas.

4.3.1.1 Tamaño y forma de las burbujas.

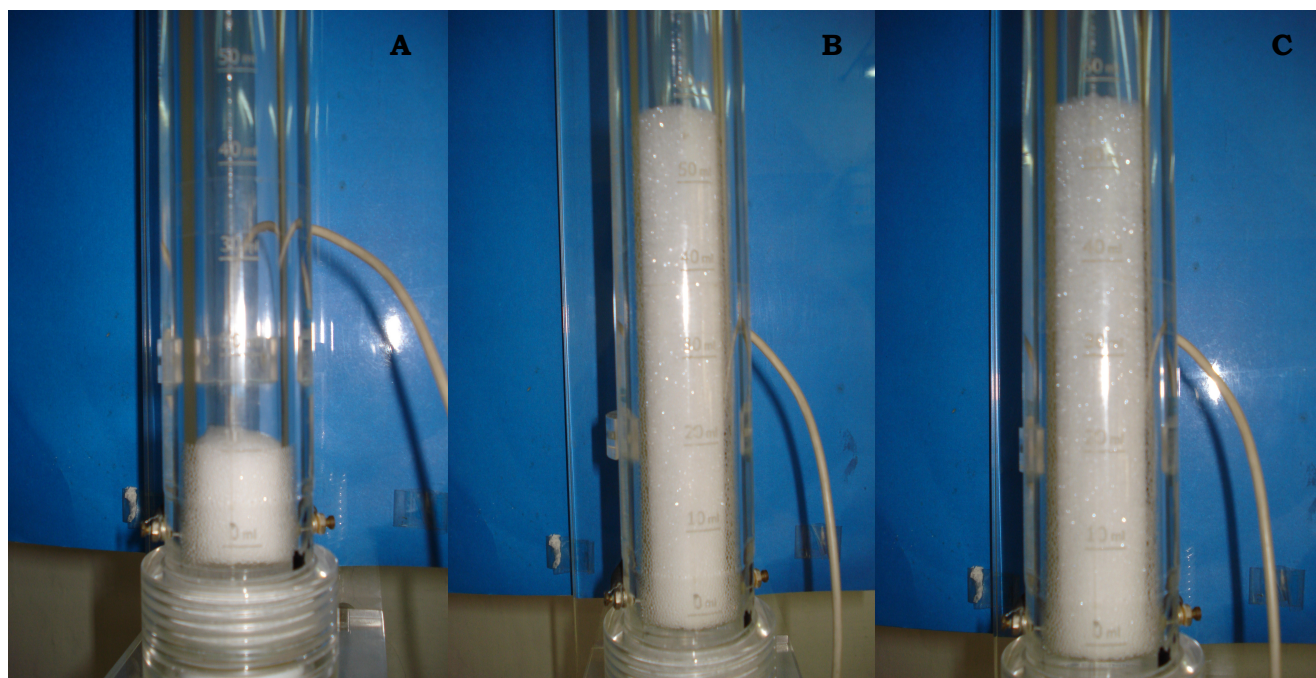


Figura 4.4 Imágenes correspondientes a distintas etapas de la formación de una espuma elaborada con β -lactoglobulina sin tratamiento térmico, [proteína] = 1 mg/mL,

pH 7,5. A) Volumen de espuma formado: 10 mL B) volumen de espuma formado: 60 mL C) volumen de espuma formado de 60 mL luego de 1 h.

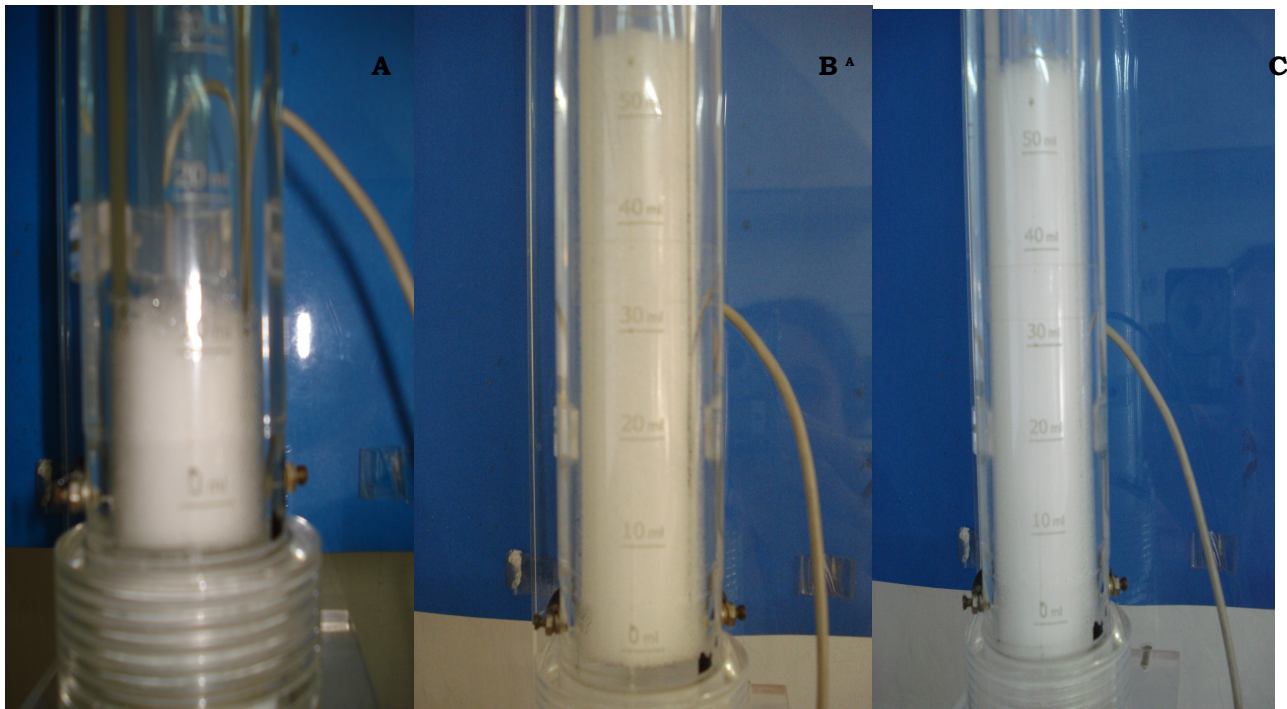


Figura 4.5 Imágenes correspondientes a distintas etapas de la formación de una espuma elaborada con β -lactoglobulina:glucosa relación 1:100 96 h, [proteína] = 1 mg/mL, pH 7,5. A) Volumen de espuma formado: 10 mL B) volumen de espuma formado: 60 mL C) volumen de espuma formado: 60 mL luego de 1 h.

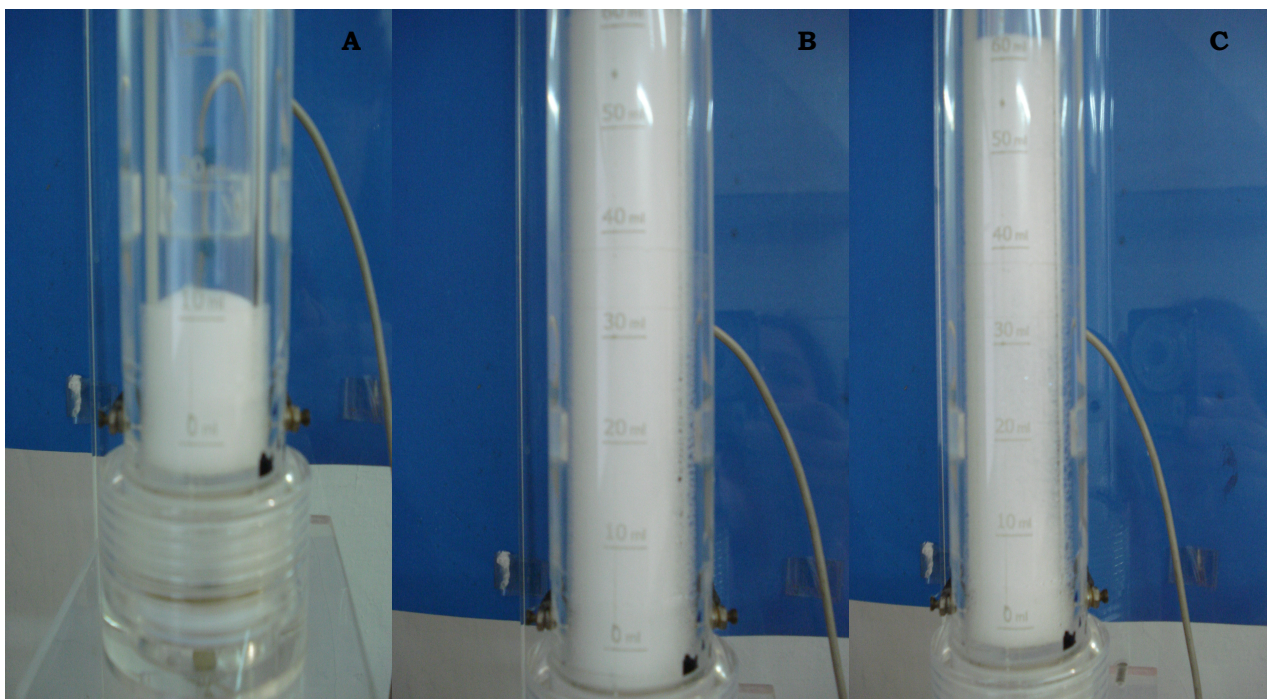


Figura 4.6 Imágenes correspondientes a distintas etapas de la formación de una espuma elaborada con β -lactoglobulina:lactosa relación 1:100 96 h, [proteína] = 1

mg/mL, pH 7,5. A) Volumen de espuma formado: 10 mL B) volumen de espuma formado: 60 mL C) volumen de espuma formado: 60 mL luego de 1 h.

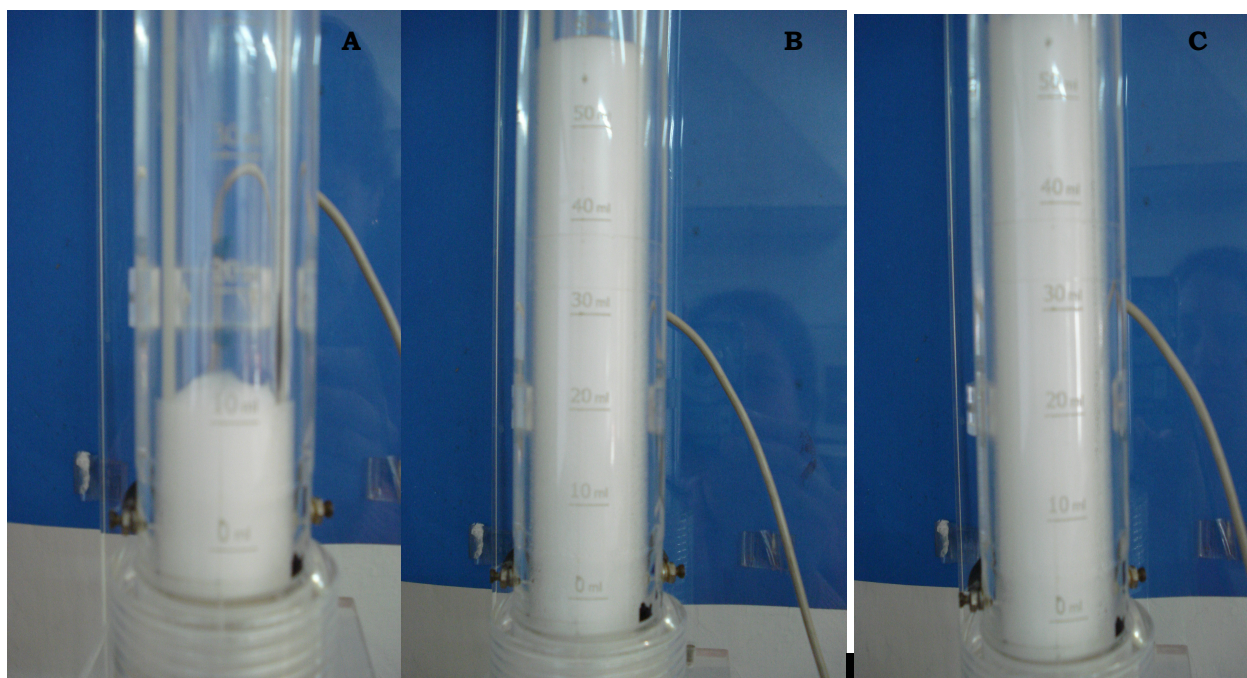


Figura 4.7 Imágenes correspondientes a distintas etapas de la formación de una espuma elaborada con β -lactoglobulina:dextrano relación 1:100 96 h, [proteína] = 1 mg/mL, pH 7,5. A) Volumen de espuma formado: 10 mL B) volumen de espuma formado: 60 mL C) volumen de espuma formado: 60 mL luego de 1 h.

Si bien no se determinó cuantitativamente el tamaño medio de las burbujas formadas, las imágenes mostradas en las Figuras 4.4 – 4.7 permiten apreciar el tamaño de las burbujas de las espumas elaboradas con β -Lactoglobulina nativa y β -Lactoglobulina modificada con glucosa, lactosa y dextrano, en las condiciones más extremas de tiempo de reacción, 96 horas, y de relación molar, 1:100.

Los atributos esenciales que una proteína debe poseer para una mejor espumabilidad son ser capaz de adsorberse rápidamente en la interfase aire-agua durante el burbujeo o batido, experimentar cambios conformacionales y reordenamientos rápidos en la interfase y reducir velozmente la tensión superficial (Damodaran, 1997).

La diferencia principal entre la β -Lactoglobulina glicosilada con los carbohidratos utilizados y la no glicosilada fue la velocidad de adsorción de la proteína en la interfase y las características de la película obtenida. La β -

Lactoglobulina sin glicosilar presentó mayor velocidad de adsorción. Al analizar las espumas formadas de manera cualitativa se observa que estas espumas son las que presentan un mayor tamaño de burbuja, diferencia que se distingue más nítidamente cuando se alcanza un volumen de espuma de 60 mL (Figura 4.4 B) y no en la primer etapa de formación entre 0 y 10 mL de espuma (Figura 4.4 A)

Prins (1988) indica que en el espumado por burbujeo el radio de la burbuja en el momento de escapar del orificio se puede representar por la

$$R = \left(\frac{3\gamma r}{2\rho g} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (4.1)$$

expresión:

donde: γ es la tensión superficial, r es el radio del orificio de la placa porosa, ρ es la densidad de la solución y g es la aceleración de la gravedad.

Esta ecuación (4.1) se puede reordenar como

$$R = \left(\frac{3r}{2\rho g} \right)^{\frac{1}{3}} \times (\gamma)^{\frac{1}{3}} \quad (4.2)$$

Para un caso particular con r constante, R variará sólo con la raíz cúbica de γ , entonces la relación de tamaño inicial de burbujas preparadas con distintas soluciones de proteína estará dada por:

$$\frac{R1}{R2} = \left(\frac{\gamma 1}{\gamma 2} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (4.3)$$

De esta manera la relación de tamaño inicial de burbujas preparadas con distintas soluciones de proteína dependerá de la raíz cúbica del cociente de tensiones superficiales que se alcancen durante la formación de la espuma. Cuando se estudió la cinética de disminución de tensión superficial no se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos para todas las muestras ensayadas, por lo que no deberían existir, en principio, diferencias en el tamaño de burbujas correspondientes a las distintas muestras. Sin embargo, el radio de las burbujas de la espuma de las proteínas sin glicosilar, como se indicó previamente, fue mayor que el correspondiente a las burbujas generadas por las proteínas glicosiladas, por consiguiente es

razonable pensar que existe otro u otros factores que estarían afectando el tamaño de las burbujas de la espuma recién preparada.

Durante el espumado, luego que las burbujas se forman, se separan debido a las diferencias de densidad con la fase líquida. Estas burbujas se acumulan unas sobre otras y en este proceso se forman películas entre las mismas. El proceso de formación de una espuma incluye procesos que corresponden a la etapa de desestabilización (Halling 1981). Cuando se forma una película entre dos burbujas y las burbujas se acercan, a menudo se aplastan y la película queda expuesta a un esfuerzo de estiramiento frecuentemente complejo, en que el área superficial gas-líquido aumenta rápidamente (Salaguer y col., 2003). Aquí se pondría en juego el mecanismo de Gibbs-Marangoni. Si la resistencia de la película formada no es suficiente esta se rompe y da origen a otras burbujas de mayor tamaño. También es factible que el aumento del tamaño de las burbujas se de a través del mecanismo de desproporción de Ostwald (Walstra, 1996b).

En la Figura 4.4 se puede observar que la espuma elaborada con β -Lactoglobulina sin glicosilar (Figura 4.4 A) es más densa al comienzo del espumado con burbujas de menor tamaño que al final del burbujeo (Figura 4.4 B). En cambio, en el caso de las espumas elaboradas con β -Lactoglobulinas glicosiladas, no se observan diferencias en el aspecto de la espuma y el tamaño de las burbujas entre el comienzo y el final del proceso de burbujeo. Esto sugiere que las muestras de β -Lactoglobulina glicosiladas con glucosa, lactosa y dextrano forman una película más gruesa e hidratada en la interfase, como se encontró en el estudio de viscoelasticidad, debido a la presencia de un mayor número de interacciones intermoleculares físicas y covalentes. Eso hubo de conferir a la película formada una mayor resistencia frente a los procesos de desestabilización, evitando así el aumento del tamaño de las burbujas.

Las imágenes de las espumas de β -Lactoglobulina glicosiladas con glucosa (4.5 C), lactosa (4.6 C) y dextrano (4.7 C) obtenidas una hora después de su preparación no mostraron grandes diferencias ni en la forma ni en el tamaño de las burbujas respecto a las espumas recién formadas (4.5 B, 4.6 B y 4.7 B). Las espumas correspondientes a la β -Lactoglobulina nativa mostraron un aumento significativo del tamaño de las burbujas a la hora de la formación respecto (4.4 C) al correspondiente a la espuma recién formada (4.4 B). Estos resultados indican que las espumas elaboradas con β -Lactoglobulina

glicosiladas presentan una mayor estabilidad que aquellas formuladas con β -Lactoglobulina nativa.

La estabilidad de las espumas formadas se discutirá desde un punto de vista cuantitativo en la sección 4.3.2.

4.3.1.2. Volumen máximo de líquido retenido en la espuma (V_{LEmax}) y velocidad de pasaje del líquido a la espuma (V_i)

La medida conductimétrica de la fase líquida de una espuma permite determinar el volumen de líquido incorporado a la espuma (V_{LE}) en función del tiempo:

$$V_{LE}(t)(mL) = \left(\frac{Ct}{Ci} \right) \times V_{Li} \quad (2.27)$$

donde:

$V_{LE}(t)$: volumen de líquido en la espuma a un tiempo t

V_{Li} : volumen de solución de proteína inicial

Ci : conductividad inicial (correspondiente al V_{Li})

Ct : conductividad a tiempo t .

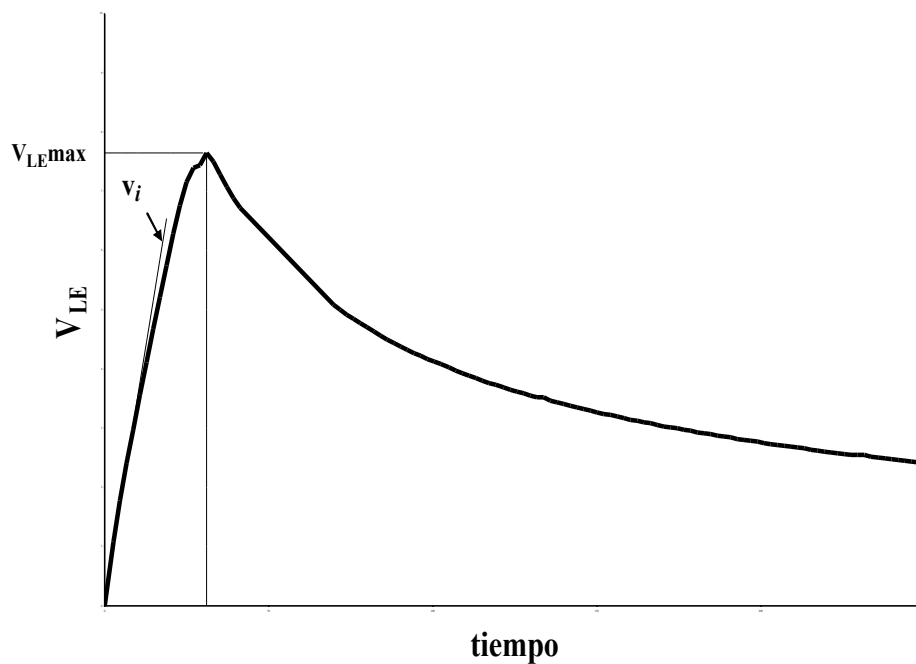


Figura 4.8. Curva experimental de V_{LE} en función del tiempo. V_{LEmax} volumen máximo de líquido retenido en la espuma y V_i velocidad de pasaje del líquido a la espuma.

Tabla 4.4: Volumen máximo de líquido retenido en la espuma (V_{LEmax}) y velocidad de pasaje del líquido a la espuma (V_i), para las muestras en estudio.

	V_{LEmax} (mL)		V_i (mL/s)	
Lg s tt	7,1±0.6	a	0,23±0.03	a
Lg c tt 51h	7,1 ± 0.2	a	0,22±0.02	a
Lg c tt 96h	7,0±0.3	a	0,23±0.01	a
10 51 G	7,3± 0.9	b	0,22± 0.07	a
10 96 G	7,8± 0.4	c	0,28± 0.05	b
100 51 G	7,4± 0.3	b	0,22± 0.02	a
100 96 G	7,7 ± 0.2	c	0,28 ± 0.01	b
10 51 L	7,6 ±0.3	c	0,27 ±0.01	b
10 96 L	8,0 ± 0.2	c	0,30 ±0.02	b
100 51 L	8,0 ± 0.1	c	0,28 ± 0.02	b
100 96L	8,0 ± 0.9	c	0,22± 0.07	a
10 51 D	8,7 ± 0,2	d	0,32 ± 0,04	c
10 96 D	7,9 ± 0,3	c	0,26 ± 0,02	b
100 51 D	8,4 ± 0,3	d	0,28 ± 0,02	b
100 96 D	8,4 ± 0,3	d	0,25 ± 0,01	b

Concentración de muestra: 1 mg/mL en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,5. Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0.05$)

A partir de V_{LE} se pueden calcular varios parámetros de formación de espuma (Figura 4.8) entre ellos el volumen máximo de líquido retenido en la espuma (V_{LEmax}) y la velocidad de pasaje del líquido a la espuma (V_i), dada por la pendiente inicial de la curva V_{LE} vs t, parámetro propuesto por Wagner y col. (1996).

Tanto los valores de V_i como de V_{LEmax} correspondientes a las espumas elaboradas con las muestras glicosiladas fueron significativamente mayores que las preparadas con β -Lactoglobulina sin glicosilar. Entre las proteínas sin glicosilar no se encontraron diferencias significativas con el tiempo de calentamiento (Tabla 4.4). Los valores de V_{LEmax} y V_i correspondientes a las espumas de β -Lactoglobulina glicosilada con glucosa presentaron un aumento significativo ($\alpha \leq 0.05$) con el tiempo de reacción, no existiendo diferencias con la relación molar empleada. Estas variaciones no fueron detectadas para el caso de las espumas formuladas con β -Lactoglobulina glicosilada con lactosa y dextrano (Tabla 4.4).

Los resultados de V_i y V_{LEmax} mostraron una tendencia de aumento en función del tamaño del carbohidrato utilizado en la glicosilación (Tabla 4.4)

Graham y Phillips (1979) demostraron que el factor más importante para la espumabilidad de una solución de proteína es la velocidad a la cual la proteína puede reducir la tensión superficial, pues una nueva área superficial está siendo creada continuamente durante el burbujeo o batido. Las proteínas que se adsorben rápidamente y rápidamente experimentan cambios conformacionales en la interfase aire-líquido formada durante el burbujeo, frecuentemente exhiben mejor espumabilidad que aquellas que se adsorben lentamente y resisten el desplegamiento en la interfase (Damodaran, 1996). De acuerdo a Kitabatake y Doi (1988) la espumabilidad de las proteínas no está relacionada con su tensión superficial de equilibrio, pero sí con la velocidad de disminución de la tensión superficial.

Como ya se señaló en la sección 4.1, no existen diferencias significativas entre los valores de γ_e correspondientes a las muestras. La diferencia principal entre las muestras de β -Lactoglobulina glicosiladas y no glicosiladas con respecto a la tensión superficial radicó en la velocidad de disminución de la tensión superficial debida a la adsorción de las proteínas en la interfase, por lo que la única correlación que se puede plantear entre la variación de los parámetros de espumabilidad estudiados, V_i y V_{LEmax} , con la cinética de modificación de la tensión superficial es con los valores de k_a discutidos con anterioridad (sección 4.1), resultado que no presentó una buena correlación (R^2 menor a 0,6). Al igual que cuando se discutió la diferencia de tamaño de burbuja sería apropiado plantear que deben existir otras causas responsables de las diferencias observadas en los parámetros V_i y V_{LEmax} correspondientes a las espumas obtenidas con las distintas proteínas estudiadas. Según Wagner y Guéguen (1999a), el parámetro V_i da información del comportamiento de la proteína en la etapa inicial de formación de la espuma, en la que los procesos de desestabilización, como la ruptura de la película, la desproporción de Ostwald y el drenado gravitatorio de líquido, son incipientes. La desproporción de Ostwald (Wagner, 2000) consiste en el crecimiento de las burbujas grandes a expensas de las pequeñas por difusión de gas a través de la lamela, ya que la diferencia de radio entre las burbujas grandes y las pequeñas produce un gradiente de presión que según la ley de Laplace es igual a:

$$\Delta P = \left[\left(\frac{1}{R_g} \right) - \left(\frac{1}{R_p} \right) \right] \gamma \quad (4.4)$$

donde R_g y R_p son los radios de las burbujas grandes y pequeñas respectivamente. El mecanismo de desestabilización por drenado de líquido es (Wagner, 2000; Salager y col. 2003) debido al drenado del líquido hacia abajo, en primera instancia por simple acción de la gravedad sobre el líquido que se encuentra en las burbujas, luego por fenómenos más complejos ya que la diferencia de curvatura entre los bordes de Plateau y la parte plana de las películas producen un gradiente de presión según la ley de Laplace que ahora se puede expresar como:

$$\Delta P = \left[\left(\frac{1}{R_l} \right) - \left(\frac{1}{R_{bP}} \right) \right] \gamma \quad (4.5)$$

donde R_l y R_{bP} son los radios de curvatura de la lamela y del borde de Plateau respectivamente. Esta diferencia de presión (ΔP) es la fuerza motriz que desplaza el líquido de la lamela interburbuja hacia los bordes de Plateau, mediante el mecanismo llamado succión capilar. El líquido es luego drenado por acción de la gravedad desde los bordes de Plateau hacia la parte inferior de la espuma. El tamaño de burbuja es uno de los parámetros que influye en la cantidad de líquido drenado y cuanto mayor es el radio de la burbuja, mayor será R_l y por tanto menor será ΔP y el drenado de líquido.

La desproporción de Ostwald, el efecto de borde de Plateau y el drenado gravitatorio de líquido, llevan al drenado de líquido de la espuma, que en el proceso de formación incipiente, debido a su mayor crecimiento conduciría a una menor velocidad inicial de incorporación de líquido y a su vez a una menor incorporación de volumen de líquido en la espuma. La tensión superficial también influye en el valor de ΔP , pues a menor γ menor ΔP y por tanto menor fuerza impulsora de los procesos de desproporción de Ostwald y de drenado gravitatorio de líquido (Panizzolo 2005).

Suponiendo en primera instancia iguales valores R_g , R_p , R_l y R_{bP} para las distintas muestras ensayadas, la relación de ΔP de las burbujas de espumas preparadas con distintas soluciones de proteína, tanto para la

$$\frac{\Delta P_1}{\Delta P_2} = \frac{\gamma_1}{\gamma_2} \quad (4.6)$$

desproporción de Ostwald como para el drenado o escurrido gravitatorio de líquido, se puede expresar como:

Por lo tanto, la relación de ΔP dependería del cociente de tensiones superficiales que se alcancen durante la formación de la espuma. Como ya se indicó no existe diferencia significativa entre los valores de γ de las distintas muestras analizadas. En consecuencia es evidente que las diferencias de ΔP , y por tanto de V_i y V_{LEmax} , no se deben a diferencias en los valores de los valores de γ alcanzados.

En las espumas que durante la formación se logren menores tamaños de burbuja será mayor el ΔP , es decir que se generará una mayor fuerza impulsora de drenado y desproporción. Si se mantiene esta línea argumentativa y se asocia el menor tamaño de la burbujas de las muestras glicosiladas con el hecho de resistir mejor los procesos incipientes de desestabilización de la espuma, la mayor velocidad de incorporación de líquido se podría correlacionar con el hecho que las burbujas de menor tamaño, formadas a partir de las soluciones de β -Lactoglobulina glicosiladas con glucosa, lactosa y dextrano, resistieron mucho mejor los procesos incipientes de desestabilización de la espuma, como ser la ruptura de la película, la desproporción de Ostwald y el drenado gravitatorio de líquido. Esto también explicaría el hecho, ya señalado, que las espumas de β -Lactoglobulina sin glicosilar hayan presentado un menor valor de V_{LEmax} .

A su vez, en el caso de las espumas obtenidas con β -Lactoglobulina modificada con glucosa, los valores de V_i y V_{LEmax} aumentaron con el tiempo de reacción, mientras que en el caso de β -Lactoglobulinas modificadas con lactosa y dextrano aumentaron al incrementarse el tamaño del carbohidrato utilizado. Este incremento podría estar relacionado con el número de carbohidratos unidos a las proteínas, los cuales modificarían la película formada aumentando la viscosidad de la lamela y facilitando la formación de una película cohesiva de varias capas de moléculas de proteína en la interfase. Esto se correlaciona con los resultados obtenidos por MALDI-TOF-MS, método que, como se ha discutido anteriormente, permite cuantificar el número de grupos de carbohidrato que se han unido a la molécula de β -Lactoglobulina en cada condición de reacción. Recordemos que en el caso de glucosa se produce un aumento significativo en el número de monómeros unidos a la proteína al incrementarse el tiempo de reacción, pasando de 7 a 15 y de 8 a 19 para 51 y

96 horas de reacción, mientras que en el caso de lactosa y dextrano no se verifica este comportamiento, obteniéndose valores promedio de 7 y 4 residuos unidos por proteína para lactosa y dextrano.

Los cambios en la película superficial debido al distinto número de grupos carbohidratos unidos a la proteína en cada condición mejoraron la resistencia de la película durante el espumado con respecto a la ruptura y desproporción de Ostwald. Como ya fue mostrado y discutido, las muestras de β -Lactoglobulina glicosiladas poseen una estructura diferente de la de β -Lactoglobulina nativa, las β -Lactoglobulinas glicosiladas presentan una mayor flexibilidad (sección 4.2), por lo que poseen una mayor facilidad de reacomodo y de interacción en la película formada en la interfase proporcionándole mayor resistencia y evitando así un aumento del tamaño de burbuja por desproporción de Ostwald y coalescencia, lo que conduciría a su vez a mayores valores de V_i y V_{LEmax} en la espuma. Las películas formadas con soluciones de β -Lactoglobulina glicosiladas han de estar más hidratadas cuanto mayor es el tamaño del carbohidrato sustituyente, por lo que esto ha de tener influencia en un aumento de V_i y V_{LEmax} de la espuma.

4.3.2 Estabilidad de espumas

Para evaluar la estabilidad de las espumas formadas se utilizó el modelo de segundo orden con dos términos desarrollado por Panizzolo (2005):

$$V(t) = \frac{V_g^2 k_g t}{(V_g k_g t + 1)} + \frac{V_d^2 k_d t}{(V_d k_d t + 1)} \quad (2.28)$$

donde:

k_g : es la constante de velocidad correspondiente al proceso de drenado gravitatorio

k_d : es la constante de velocidad correspondiente al proceso de difusión de gas o desproporción.

V_g y V_d : son los parámetros de amplitud correspondiente al proceso de drenado gravitatorio y al proceso de difusión de gas o desproporción.

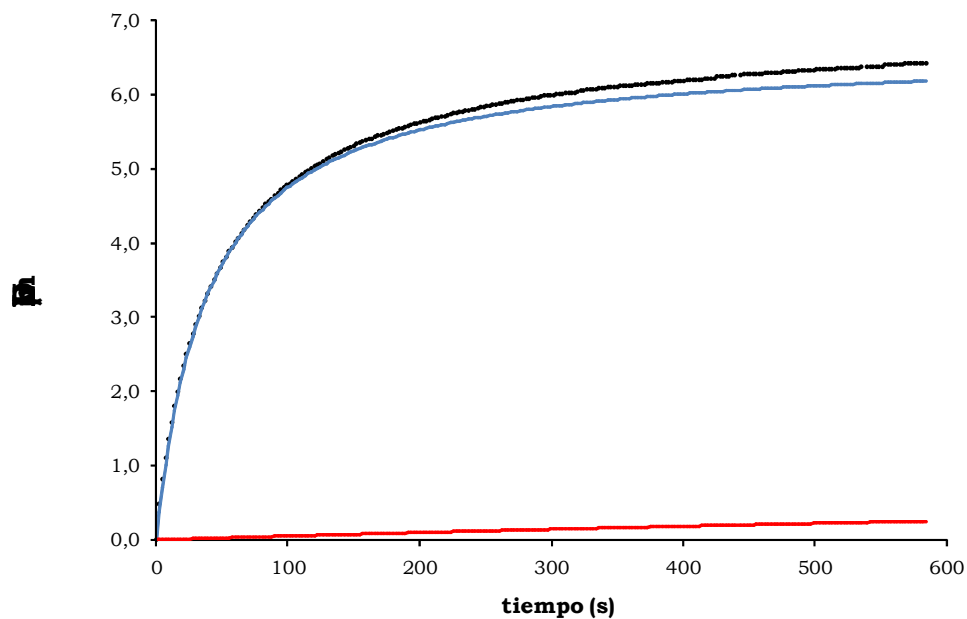


Figura 4.9. Volumen de líquido drenado de una espuma elaborada con β -Lactoglobulina en función del tiempo del proceso total de desestabilización (—), del proceso de desestabilización por drenado gravitatorio (—) y del proceso de desestabilización por desproporción (—).

Tabla 4.5. Parámetros de estabilidad de las espumas correspondientes a las muestras ensayadas

	kg (*E 03) (ml⁻¹.s⁻¹)		kd (*E 04) (ml⁻¹.s⁻¹)	
Lg s tt	5,4±0.6	a	9± 3	a
Lg c tt 51h	4,6±0.2	b	4±.1	b
Lg c tt 96h	4,2±0.2	b	2±1	b,c
10 51 G	4,1±0.1	b	4± 1	b
10 96 G	3,5±0.1	c	3± 1	b
100 51 G	3,9±0.2	b,c	1± 1	c
100 96 G	3,6±0.2	c	4± 1	b
10 51 L	4,1±0.1	b	2±1	b,c
10 96 L	3,5± 0.2	c	1±1	c
100 51 L	3,4 ± 0.1	c	3±1	b
100 96L	3,4 ± 0.3	c	3±1	b
10 51 D	3,4 ± 0,5	c	4± 2	b
10 96 D	3,3 ± 0,6	c	2 ± 2	b,c
100 51 D	3,7 ± 0,8	c	1 ± 1	c
100 96 D	2,9 ± 0,6	c	2 ± 1	b,c

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0.05$)

En la Figura 4.9 se representa el volumen de líquido drenado de una espuma elaborada con β -Lg s tt en función del tiempo de los dos procesos de desestabilización contemplados en la ecuación 2.28 como así también el volumen de líquido drenado correspondiente al proceso total de desestabilización de la espuma. Se observa claramente el del proceso de drenado gravitatorio frente al de desproporción. A los 600 s de iniciarse el proceso de desestabilización se separó por drenado gravitatorio el 80% del volumen máximo de espuma mientras que debido a la desproporción sólo drenó un 7%.

Los valores de las k correspondientes al proceso de drenado gravitatorio son siempre significativamente mayores que las correspondientes al proceso de desproporción, siendo la diferencia de por lo menos un orden de magnitud (Tabla 4.5). Esto concuerda con lo informado por Yu y Damodaran (1991) quienes argumentaron que la magnitud del decaimiento de la espuma por difusión de gas entre burbujas es significativa solamente cuando se está por debajo de un espesor crítico de la lamela, por lo que al inicio del proceso predomina el drenado gravitacional y en la etapas finales empieza a tener incidencia el proceso de drenado de líquido debido a la desproporción de Ostwald.

Tabla 4.6. Proporciones de volumen de líquido drenado mediante escurrido gravitatorio (V_g) y desproporción (V_d) de las muestras ensayadas

	V_g % (mL/100 mL)	V_d % (mL/100mL)
<i>Lg s tt</i>	83 a	17 a
<i>Lg c tt 51h</i>	83 a	17 a
<i>Lg c tt 96h</i>	85 a	15 a
<i>10 51 G</i>	82 a	18 a
<i>10 96 G</i>	86 a,b	14 a,b
<i>100 51 G</i>	90 b	10 b
<i>100 96 G</i>	86 a,b	14 a,b
<i>10 51 L</i>	86 a,b	14 a,b
<i>10 96 L</i>	86 a,b	14 a,b
<i>100 51 L</i>	88 b	12 b
<i>100 96 L</i>	90 b	10 b
<i>10 51 D</i>	90 b	10 b
<i>10 96 D</i>	91 b	9 b
<i>100 51 D</i>	91 b	9 b
<i>100 96 D</i>	91 b	9 b

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0.05$)

Además del estudio de las constantes de velocidad es interesante ver en que medida contribuyen ambos mecanismos al total de volumen de líquido drenado. Para ello se determinaron las proporciones de volumen de líquido drenado mediante escurrido gravitatorio (V_g) y debido a la desproporción (V_d). El efecto de los distintos parámetros se puede apreciar en la Tabla 4.6. En todos los casos ensayados la proporción de líquido drenado por escurrido gravitatorio fue significativamente superior (nunca menor de 0,80) al volumen drenado debido a la desproporción. Wagner (2000) ha señalado que en las espumas recién formadas predominan los mecanismos de flotación y drenado, en tanto que en las espumas poliédricas predominan la desproporción y el colapso. La fuerza impulsora de los mecanismos de drenado y desproporción es la diferencia de presión (ΔP) debido a la ley de Laplace, en tanto que el tamaño de burbuja es determinante del valor de ΔP , el cual aumenta con la disminución del tamaño de burbuja. La cantidad de líquido drenado por escurrido gravitatorio y por desproporción no depende solamente del tamaño de burbuja sino también de la resistencia de la película de proteína en la interfase. Entonces es posible que el tamaño de burbuja logrado en los ensayos realizados y las características de la película formada sean tales que de la combinación de ambos resulta el predominio del drenado sobre la desproporción de Ostwald.

Por otra parte el método de generación de espuma también influye sobre las propiedades espumantes de las proteínas. Si el aire se introduce por burbujeo, suele producirse una espuma “húmeda” con un tamaño de burbuja relativamente grande. El batido a una velocidad moderada suele producir una espuma con burbujas de tamaño pequeño, debido a la acción cizallante que desnaturaliza parcialmente a la proteína antes que se adsorba en la interfase (Damodaran, 1996). De ahí que sea posible que en las espumas obtenidas por batido, donde el tamaño de burbuja es menor que el obtenido por burbujeo, la proporción de líquido drenado por desproporción sea mayor que el encontrado en el presente trabajo y hasta llegue a predominar.

Es importante indicar que los valores de V_g y V_d , a diferencia de lo que ocurre con k_g y k_d , tienen una dependencia mutua puesto que son valores proporcionales. Los valores de V_g en el caso de las espumas obtenidas a partir de las muestras glicosiladas con glucosa, lactosa y dextrano aumentaron en tanto que k_g y k_d disminuyeron. Este retardo en el drenado y la desproporción sería debido a la presencia de una película proteica en la interfase formada

por varias capas de moléculas de proteína lo que la haría más gruesa y cohesiva. Esta película pudo resistir mejor la difusión de gas ya que el volumen máximo de líquido drenado debido solo a difusión disminuyó proporcionalmente más que el volumen de líquido drenado por escurrido gravitatorio. En el caso de las espumas elaboradas con β -Lactoglobulina glicosiladas con dextrano, se observó una menor proporción en el volumen drenado debido a la desproporción en comparación con las β -Lactoglobulina glicosiladas con glucosa o lactosa (Tabla 4.6). Ello se correlaciona con los resultados de viscoelasticidad discutidos previamente puesto que la película superficial formada por β -Lactoglobulina modificada con dextrano sería más resistente por estar más hidratada.

Resumen y conclusiones parciales

Este Capítulo se ha dedicado al estudio de las propiedades espumantes de la β -Lactoglobulina nativa y glicosilada con los tres carbohidratos utilizados en este trabajo.

Las propiedades de las espumas encontradas correlacionan con los cambios físicoquímicos-estructurales discutidos en el Capítulo 3. Los enlaces covalentes formados entre la β -Lactoglobulina y los distintos carbohidratos afectan las propiedades de las proteínas en la interfase aire-agua influyendo directamente en la formación y en la estabilidad de las espumas.

Resumiendo las conclusiones parciales que se extraen del estudio son:

- ✓ La glicosilación promovió la polimerización de la β -Lactoglobulina por formación de enlaces estables covalentes entre los dímeros. Esto permitió la formación en la interfase aire-agua de una red más flexible que se evidencia por una disminución en la pendiente del módulo elástico ($P \epsilon_d$).

- ✓ Las proteínas glicosiladas presentaron una velocidad de adsorción menor que las nativas, lo que significaría que poseen una menor

capacidad de formación de espumas. Sin embargo, debido a la formación de una capa interfacial más viscoléastica y más concentrada, debido al mayor número de interacciones moleculares, las proteínas glicosiladas se comportaron como mejores espumantes que la β -lactoglobulina sin glicosilar. Este hecho se pudo apreciar en los valores alcanzados por los parámetros V_i y V_{LEmax} que aumentaron significativamente con la glicosilación.

- ✓ El tamaño de burbuja es uno de los parámetros que influye en la cantidad de líquido drenado de una espuma. Cuanto mayor es el radio de la burbuja menor es el drenado de líquido. Las espumas de β -Lactoglobulina glicosilada, a pesar de presentar un tamaño menor de burbuja presentaron menor velocidad de drenado lo que indicaría que las características y desempeño de esas proteínas en la lamela y en la película superficial son tales que logran superar una situación donde las fuerzas impulsoras para el drenado son mayores. Este comportamiento acrecienta la valorización de su capacidad estabilizadora con respecto a las proteínas nativas.
- ✓ El tratamiento térmico produjo una disminución significativa ($\alpha \leq 0,05$) de la constante de velocidad correspondiente al proceso de drenado gravitatorio k_g y al proceso de difusión de gas o desproporción (k_d), lo que implica un aumento en la estabilidad de las espumas generadas.
- ✓ El número y el tamaño del carbohidrato unido a la proteína influyó en la estabilidad de las espumas formadas. Esto se evidencia por el aumento significativo ($\alpha \leq 0,05$) de las constantes de estabilidad (k_g y k_d). La modificación con dextrano generó espumas más estables que lactosa y esta a su vez espumas más estables que glucosa. Al comparar el comportamiento de las espumas obtenidas con los compuestos de β -Lactoglobulina glicosilados a mayor tiempo de reacción, se detectó un aumento significativo ($\alpha \leq 0,05$) en la estabilidad del proceso de drenado gravitatorio solo en las muestras glicosiladas con glucosa. La relación molar empleada en la glicosilación de la β -Lactoglobulina no influyó significativamente en la estabilidad de las espumas formadas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades Emulsionantes

5.- Propiedades Emulsionantes

5.1.- Determinación de tensión interfacial (aceite/agua)

Se evaluaron las propiedades tensioactivas en la interfase agua/aceite de β -Lactoglobulina glicosilada con glucosa, lactosa y dextrano así como la de los blancos de reacción mediante tensiometría de gota, según se ha descrito en el Capítulo 2.

Para seguir el proceso de modificación de la tensión interfacial con el tiempo se utilizó el modelo descrito en la determinación de la tensión superficial (aire-agua) (sección 4.1), obteniéndose las constantes de velocidad correspondientes a los procesos de adsorción (k_a) y reordenamiento (k_r) de las proteínas en la interfase aceite-agua, los parámetros de amplitud (A_a , A_r) y la tensión interfacial de equilibrio (γ_e)

Tabla 5.1: Constante de velocidad de adsorción (k_a), constante de velocidad de reordenamiento (k_r), y tensión interfacial de equilibrio (γ_e) en la interfase de proteínas para las distintas muestras.

Muestra	K_a (s-1)	$K_r \cdot 10^{-3}$ (s-1)	γ_e (mN/m)
<i>Lg s tt</i>	1,00 ± 0,01 a	1,0 ± 0,2 a	9,8 ± 0,6 a
<i>Lg c tt 51h</i>	1,00 ± 0,01 a	1,1 ± 0,1 a	10,0 ± 0,1 a
<i>Lg c tt 96h</i>	0,97 ± 0,03 a	1,4 ± 0,2 a	9,6 ± 0,1 a
<i>10 51 G</i>	1,00 ± 0,01 a	1,0 ± 0,2 a	10,5 ± 0,1 b
<i>10 96 G</i>	1,00 ± 0,01 a	1,1 ± 0,3 a	11,3 ± 0,2 d
<i>100 51 G</i>	0,99 ± 0,01 a	1,2 ± 0,2 a	11,4 ± 0,1 d
<i>100 96 G</i>	1,00 ± 0,01 a	1,5 ± 0,5 a	11,3 ± 0,5 d
<i>10 51 L</i>	1,00 ± 0,01 a	1,0 ± 0,3 a	10,9 ± 0,1 c
<i>10 96 L</i>	0,99 ± 0,01 a	1,1 ± 0,2 a	10,9 ± 0,1 c
<i>100 51 L</i>	0,99 ± 0,01 a	1,2 ± 0,2 a	10,9 ± 0,1 c
<i>100 96 L</i>	0,99 ± 0,01 a	1,2 ± 0,2 a	11,2 ± 0,1 d
<i>10 51 D</i>	0,99 ± 0,01 a	1,0 ± 0,2 a	11,0 ± 0,1 c
<i>10 96 D</i>	0,99 ± 0,01 a	1,0 ± 0,2 a	9,8 ± 0,1 a
<i>100 51 D</i>	1,01 ± 0,01 a	1,0 ± 0,3 a	11,8 ± 0,1 e
<i>100 96 D</i>	0,99 ± 0,01 a	1,2 ± 0,3 a	11,6 ± 0,6 e

Concentración de muestra: 1 mg/mL en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,5.
Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0.05$)

Los valores de la velocidad de adsorción (k_a) en la interfase aceite-agua para todas las soluciones de β -Lactoglobulina estudiadas no presentaron diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) entre ellas (Tabla 5.1). Esto sugiere que el proceso de adsorción global de la proteína en la interfase no fue afectado por la glicosilación ni por el tratamiento térmico. De acuerdo a lo planteado en trabajos previos por Magdassi y Kamyshny (1996) y Walstra (1996a), la velocidad de absorción en la interfase depende de las características moleculares de la proteína (por ejemplo, el tamaño, la conformación y las interacciones que puede establecer), la naturaleza de los líquidos inmiscibles (por ejemplo, la viscosidad), los procesos de transporte de masa (por ejemplo, la difusión y convección) y las barreras energéticas asociadas con el proceso de adsorción (por ejemplo, la disponibilidad de lugares libres, repulsión electrostática, repulsión estérica, repulsión hidrodinámica y la dinámica micelar).

La velocidad de reordenamiento (k_r) en la interfase aceite-agua fue equivalente para todas las soluciones de β -Lactoglobulina estudiadas, no encontrándose diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) entre ellas (Tabla 5.1). Lo que se encontró, y era de esperar, fue que los valores de k_a son mayores que los de k_r , pues el proceso de desplegamiento o reordenamiento de la proteína es más lento que el proceso de difusión hasta la superficie. De acuerdo con esto y considerando que la adsorción, el desplegamiento y el reordenamiento de las proteínas en la interfase son la principal causa de la disminución de la tensión superficial, es lógico esperar que estos procesos estén determinando la cinética de disminución de la tensión superficial. Además considerando que para que disminuya la tensión superficial por reordenamiento de la proteína es necesario que primero ocurra la adsorción, es razonable atribuir a k_a , que predomina en el período inicial, al proceso de adsorción de las proteínas en la interfase aire-agua.

Al principio el descenso de la tensión superficial se debería al proceso de adsorción de las proteínas, efecto que prevalecería al reordenamiento de las proteínas en la interfase. A medida que una mayor cantidad de proteína adsorbida cambia de estado conformacional su concentración interfacial disminuye y por tanto su efecto sobre la disminución de la tensión interfacial se hace cada vez menos importante hasta llegar a ser nulo. En ese proceso la concentración interfacial de las proteínas en un estado conformacional reordenado se hace preponderante y entonces predomina su contribución a la disminución de la tensión interfacial (Panizzolo, 2005).

El valor de la tensión interfacial de equilibrio de la β -Lactoglobulina sin glicosilar no presentó diferencias significativas con los diferentes tratamientos térmicos. Estas muestras presentaron valores de γ_e menores significativamente que las muestras de β -Lactoglobulina glicosiladas (Tabla 5.1). El aumento de la tensoactividad detectado se podría atribuir a una interacción más favorable de los restos aminoacídicos no polares con la fase lipídica, lo cual se corresponde con los menores valores de la hidrofobicidad superficial (H_0) ya discutidos (Tabla 3.4).

La γ_e de la β -Lactoglobulina glicosilada con lactosa no mostró diferencias significativas con el tiempo de reacción ni con la relación molar utilizada. El menor valor de γ_e se obtuvo al modificar la β -Lactoglobulina con glucosa durante el tiempo más corto de reacción y la menor relación molar ensayada (10 51 G), este comportamiento se podría asociar con la mayor hidrofobicidad (Tabla 3.4) presentada por esta muestra respecto a las otros compuestos glicosilados con glucosa. Por otro lado, las muestras modificaciones con dextrano sólo mostraron diferencias significativas en el valor de γ_e cuando la relación molar fue de 1:100.

5.2.- Comportamiento interfacial dinámico

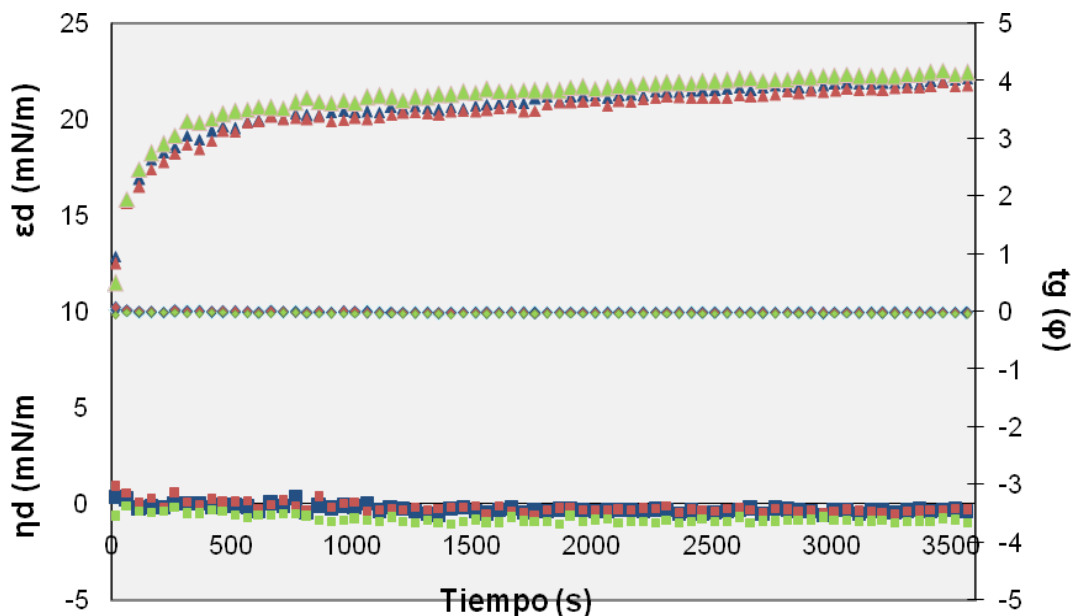


Figura 5.1. Viscosidad dilatacional interfacial (η_d), Elasticidad dilatacional interfacial, (ϵ_d) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \phi$) en función del tiempo de Lg s tt (η_d (■) ϵ_d (▲), $\text{tg } \phi$ (◆)); Lg c tt 51h (η_d (■), ϵ_d (▲), $\text{tg } \phi$ (◆)); Lg c tt 96h (η_d (■), ϵ_d (▲), $\text{tg } \phi$ (◆)). De una solución de proteína con una concentración de 1mg/mL, pH 7,5 buffer fosfato de 10 mM. Frecuencia de la oscilación: 100mHz. Amplitud de la oscilación: 10%.

La viscosidad dilatacional interfacial (η_d) y la tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \phi$), de todas las muestras de β -Lactoglobulina nativas y glicosiladas con glucosa, lactosa y dextrano, no presentan diferencias significativas con el tiempo de análisis de la viscoelasticidad interfacial. En cambio si es evidente un aumento significativo de la componente elástica (ϵ_d), la que presentó el mismo perfil con la variación del tiempo que el módulo total (E). A modo de ejemplo se muestra el comportamiento superficial dinámico de las muestras de β -Lactoglobulina sin tratamiento térmico y con tratamiento térmico de 51 y 96 horas (Figura 5.1).

La tangente del ángulo de pérdida presentó un valor comprendido entre 0,02 y 0,10 lo que significa que la película formada presenta un comportamiento puramente elástico (Tabla 5.2). Este comportamiento es igual al encontrado al estudiar el comportamiento de la interfase aire-agua (ver sección 4.2).

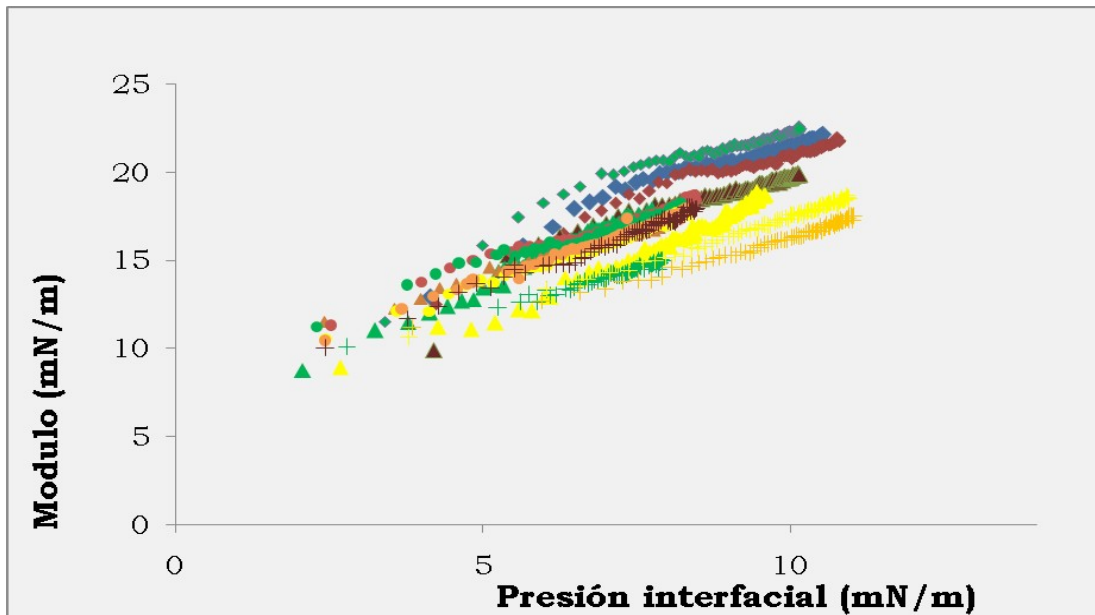


Figura 5.2 Módulo elástico en función de la presión interfacial de β -Lg s tt (◆), β -Lg c tt 51 (◆), β -Lg c tt 96h (◆), 1:10 51 G (▲), 1:10 96 G (▲), 1:100 51 G (▲), 1:100 96 G (▲), 1:10 51 L (●), 1:10 96 L (●), 1:100 51 L (●), 1:100 96 L (●), 1:10 51 D (+), 1:10 96 D (+), 1:100 51 D (+), 1:100 96 D (+).

Si se grafica el módulo elástico en función de la presión interfacial se observa un aumento progresivo del módulo equivalente al detectado en la interfase aire-agua (Figura 5.2). Para ninguna de las muestras analizadas se detectó en este tipo de diagrama un pico a las mayores presiones interfaciales, equivalente al discutido en el capítulo anterior (Sección 4.2), lo que indicaría que no se ha alcanzado en ningún caso la saturación de la monocapa con la consiguiente formación de una bicapa (Benjamins y Lucassen-Reynders, 1998; Cicuta y Hopkinson, 2001; Mellema y col., 1998).

Para evaluar el comportamiento elástico y conocer la estructura interfacial de la proteína en la interfase aceite-agua se analizó la pendiente de la parte lineal creciente del módulo elástico en función de la presión interfacial (Figura 5.2). Como se indicó anteriormente, (Sección 4.2), si la pendiente aumenta disminuye la flexibilidad de la proteína.

Tabla 5.2: Viscosidad dilatacional interfacial (η_d) y elasticidad dilatacional interfacial, (ϵ_d) a 3000 s. Pendiente del módulo elástico (P_{ϵ_d}) y tangente del ángulo de pérdida ($tg \varphi$) correspondientes a las diferentes muestras analizadas.

Muestra	E_d (mN/m)	η_d (mN/m)	P_{ϵ_d}	$tg \varphi$
---------	-----------------	--------------------	------------------	--------------

Lg s tt	21,9 ± 0,2 a	0,2 ± 0,2 a	1,9 ± 0,3 a	0,02 ± 0,04a
Lg c tt 51h	21,6 ± 0,2 a	0,1 ± 0,2 a	1,7 ± 0,3 b	0,02 ± 0,04a
Lg c tt 96h	22,2 ± 0,2 a	0,8 ± 0,3 b	1,6 ± 0,3 c	0,04 ± 0,04a
10 51 G	19,8 ± 0,2 b	1,3 ± 0,4 b	1,2 ± 0,3 d	0,06 ± 0,06a
10 96 G	17,3 ± 0,3 d	1,3 ± 0,3 b	1,2 ± 0,3 d	0,08 ± 0,06a
1 100 51 G	18,3 ± 0,3 c	1,8 ± 0,4 c	1,3 ± 0,3 d	0,07 ± 0,05a
1 100 96 G	16,9 ± 0,4 d	2,5 ± 0,5 c	1,2 ± 0,3 d	0,12 ± 0,06a
1 10 51 L	18,5 ± 0,4 c	1,4 ± 0,5 b	1,1 ± 0,3 d	0,08 ± 0,05a
1 10 96 L	18,1 ± 0,3 c	1,1 ± 0,4 b	1,2 ± 0,3 d	0,08 ± 0,04a
1 100 51 L	17,5 ± 0,2 d	1,7 ± 0,4 b,c	1,2 ± 0,3 d	0,07 ± 0,04a
1 100 96 L	17,8 ± 0,4 c,d	1,9 ± 0,5 c	1,1 ± 0,3 d	0,10 ± 0,04a
1 10 51 D	17,7 ± 0,2 c,d	0,9 ± 0,3 b	1,2 ± 0,3 d	0,06 ± 0,04a
1 10 96 D	17,8 ± 0,2 c,d	0,4 ± 0,4 a	0,8 ± 0,3 e	0,03 ± 0,06a
1 100 51 D	17,3 ± 0,3 d	1,9 ± 0,4 c	1,0 ± 0,3d,e	0,10 ± 0,05a
1 100 96 D	17,2 ± 0,4 d	2,0 ± 0,4 c	1,0 ± 0,3d,e	0,10 ± 0,06a

Concentración de muestra: 1 mg/ml en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,5.
Frecuencia de la oscilación: 100mHz. Amplitud de la oscilación: 10%. Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0.05$)

Cuando aumentó el tiempo del tratamiento térmico de la β -Lactoglobulina sin glicosilar disminuyó el valor de la pendiente significativamente ($\alpha \leq 0.05$) lo que indica una mayor flexibilidad concordante con el aumento del desplegamiento de la proteína con el tratamiento térmico (Tabla 5.2).

Las muestras glicosiladas con los distintos carbohidratos presentaron una disminución significativa ($\alpha \leq 0,05$) de P_{ed} respecto a las muestras sin modificar, este resultado es esperado dado que la glicosilación, como ya ha sido discutido, produce cambios estructurales que se expresan en una mayor flexibilidad de la β -lactoglobulina. En el caso de las soluciones preparadas con β -lactoglobulina glicosiladas con dextrano se obtuvieron valores de P_{ed} significativamente menores que los correspondientes a las soluciones de β -lactoglobulina modificadas con glucosa o lactosa (Tabla 5.2). La configuración de las moléculas de emulgente en una interfase puede tener una influencia importante sobre las propiedades fisicoquímicas de los alimentos emulsionados. La estabilidad de una emulsión depende del desplegamiento y la interacción de las moléculas de proteínas en la superficie de la gota. Cuando se despliegan las proteínas globulares, exponiendo aminoácidos reactivos que son capaces de formar interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro con sus vecinos, generan una membrana altamente viscoelástica que es resistente a la coalescencia (Dickinson y Matsumura, 1991; Dickinson 1992b). Por lo que a mayor tamaño de carbohidrato unido mayor flexibilidad de la proteína, lo que sería debido al desplegamiento de la molécula

ocasionado por la reacción de las Lys disponibles de la β -Lactoglobulina con los carbohidratos. Este desplegamiento sería mayor al aumentar el tamaño del carbohidrato unido a la proteína y además provocaría una mayor interacción entre las proteínas en la interfase generando una película mas viscoelástica y resistente a los procesos de desestabilización.

5.3.- Emulsiones de β -Lactoglobulina

5.3.1 Formación de emulsiones

En la presente sección se exponen los resultados del estudio de emulsiones o/w preparadas con β -Lactoglobulina sin glicosilar y con diferente grado de glicosilación. Las emulsiones preparadas con dispersiones acuosas diluidas y con una baja relación volumétrica entre las fases dispersa y acuosa, tienden a desestabilizarse por cremado. La floculación tiene un gran influencia sobre el cremado y puede favorecer o no la separación gravitacional dependiendo del tamaño y estructura de los flóculos (Mc Clements, 1999). Después de un tiempo considerable de almacenamiento, en la parte superior de la emulsión se forma una fase crema, la cual no es más que una emulsión más concentrada en gotas que la emulsión inicial. La fase inferior o suero está empobrecida en gotas de fase dispersa y por lo tanto enriquecida en la fase acuosa. Diversos autores como Tornberg y Hermansson (1977), Dagorn-Scaviner y col. (1987), Dickinson y col. (1997), Kauten (1991) han propuesto distintos métodos, tanto destructivos como no destructivos, para el análisis de la separación gravitacional en las emulsiones o/w.

En general, en ausencia de fuerzas externas aplicadas, la coalescencia es un mecanismo de desestabilización lento, comparado con el cremado y la floculación. Por lo tanto, excepto que el proceso de emulsificación o el agente emulsificante no hayan sido efectivos, la coalescencia tiene lugar una vez que se ha formado la fase crema, es decir, cuando la floculación y el cremado han alcanzado un grado avanzado de desarrollo. Por el contrario, en una emulsión más concentrada en fase dispersa, como la fase crema, las gotas pierden movilidad y pueden permanecer en íntimo contacto durante un período prolongado, lo cual promueve la coalescencia. La naturaleza de las interacciones coloidales entre las gotas y la resistencia del film interfacial determinará el grado de desestabilización (Mc Clements, 1999). Por

consiguiente, la estabilidad frente a la coalescencia de una emulsión o/w de baja viscosidad, se estudia a través de las características de la fase crema después de un tiempo prolongado de almacenamiento estacionario como proponen Mitidieri y col. (2001).

En este trabajo, se llevó a cabo el estudio de la estabilidad global (cremado, floculación y coalescencia) de emulsiones o/w preparadas con dispersiones diluidas (1 mg/mL) de proteína. Como se indicó en el capítulo 3, las muestras utilizadas exhibieron marcadas diferencias en la estructura, hidrofobicidad superficial, grado de avance de la reacción de Maillard, etc. Por otra parte, el hecho de emplear dispersiones acuosas diluidas permite observar más claramente la relación existente entre las características estructurales de las muestras y la estabilidad de las emulsiones resultantes.

En esta sección se analizarán las características de las emulsiones para establecer una correspondencia, en primer lugar con la estabilidad frente al cremado y en segundo lugar con el grado de coalescencia de la fase crema después de 24 horas de almacenamiento estacionario.

5.3.1.1 Concentración de proteína interfacial

Tabla 5.3 Concentración de proteína interfacial, área interfacial y concentración de proteína adsorbida de las emulsiones en estudio.

Γ (mg /m ²)	S _v (m ² /mL emulsión)	%[P _a] (mg/mL emulsión)
-----------------------------------	--	---

Lg s tt	1,57±0,08 a	0,31±0,03 a	48±2 ^a
Lg c tt 51h	1,60±0,03 a	0,30±0,03 a	48±1 ^a
Lg c tt 96h	1,87±0,06 b	0,28±0,02 a,b	52±2 ^a
10 51 G	1,91±0,02 b	0,25±0,03 b	47±1 ^a
10 96 G	1,91±0,02 b	0,25±0,02 b	47±1 ^a
100 51 G	1,74±0,16 b	0,26±0,02 b	45±6 ^a
100 96 G	1,56±0,03 a	0,26±0,03 b	41±1 ^a
10 51 L	2,52±0,05 c	0,25±0,03 b	64±2 ^b
10 96 L	2,77±0,17 c	0,24±0,03 b	66±7 ^b
100 51 L	2,36±0,07 c	0,24±0,02 b	57±3 ^b
100 96 L	2,32±0,10 c	0,25±0,02 b	59±4 ^b
10 51 D	1,79±0,02 b	0,25±0,02 b	44±4 ^a
10 96 D	2,08±0,05 c	0,23±0,02 b,c	48±2 ^a
100 51 D	2,24±0,02 c	0,23±0,02 b,c	51±1 ^a
100 96 D	2,43±0,17 c	0,21±0,02 c	52±3 ^a

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0,05$)

Las muestras glicosiladas con glucosa, lactosa y dextrano presentaron valores de Γ significativamente mayores ($\alpha \leq 0,05$) que los de las muestras sin modificar, con excepción de la muestra 1 100 96 G. La concentración de proteína interfacial de las emulsiones elaboradas con β -Lactoglobulina glicosiladas con glucosa fueron menores significativamente ($\alpha \leq 0,05$) que la β -Lactoglobulina glicosilada con lactosa y dextrano no existiendo diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) entre estas últimas. (Tabla 5.3).

Este aumento en la concentración proteica interfacial de las emulsiones preparadas con β -Lactoglobulina glicosilada estaría relacionado con los cambios conformacionales ocurridos debido a la propia glicosilación. Estos permitirían una mayor interacción entre las proteínas y por tanto un acúmulo de las mismas en la interfase.

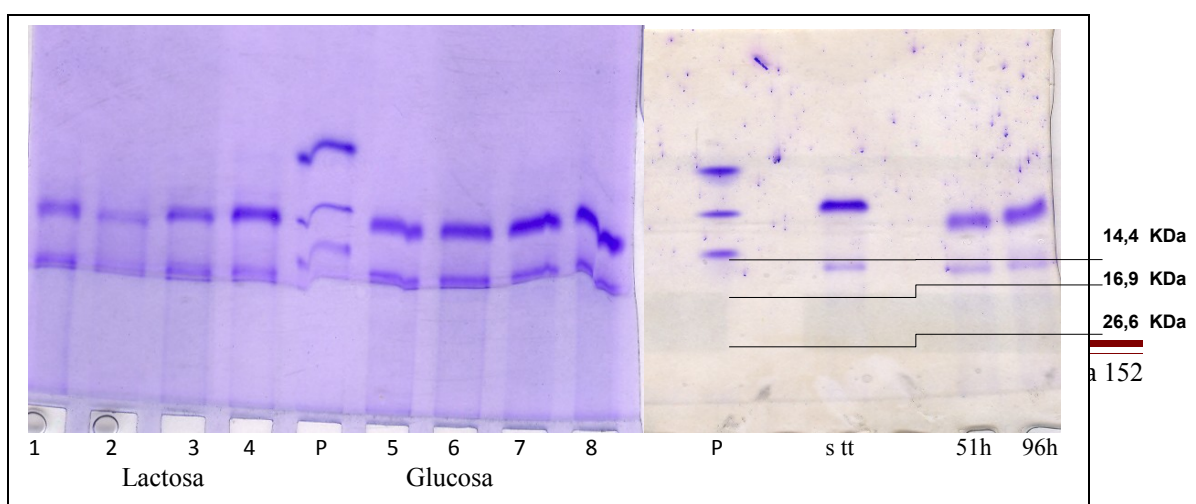


Figura 5.3 Diagramas electroforéticos PAGE-SDS correspondientes a las fracciones de proteínas absorbida en la interfase de las emulsiones formuladas con β -Lactoglobulina modificada con lactosa (calles 1 a 4) y glucosa (calles 5 a 8) y sin modificar (calles stt, 51h y 96h).

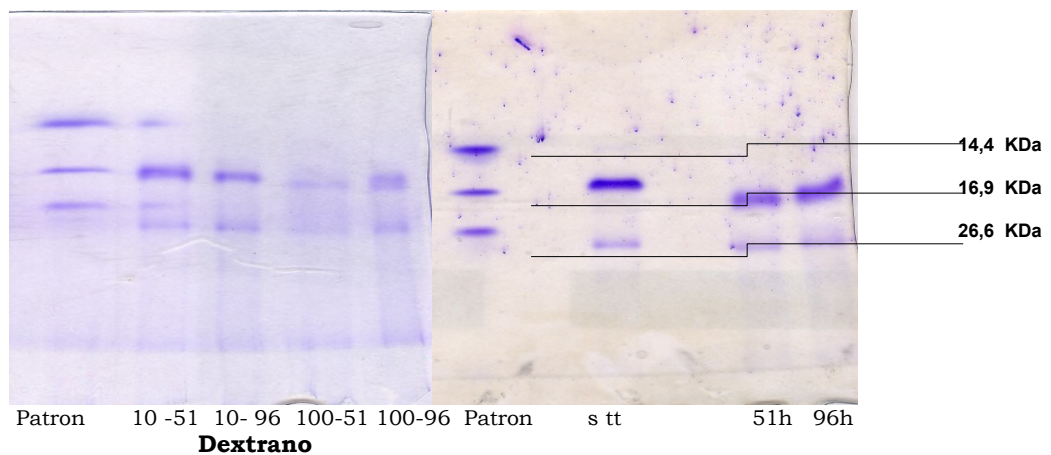


Figura 5.4 Diagramas electroforéticos PAGE-SDS correspondientes a las fracciones de proteínas absorbida en la interfase de las emulsiones formuladas con β -Lactoglobulina modificada con dextrano (calles 10-51, 10-96, 100-51 y 100-96) y sin modificar (calles stt, 51h y 96h).

Los diagramas electroforéticos obtenidos muestran que las proteínas adsorbidas en interfase corresponden a las estructuras proteicas de menor PM, en particular monómeros y dímeros (Figuras 5.3 y 5.4).

5.3.1.2.- Distribución de tamaño de partícula.

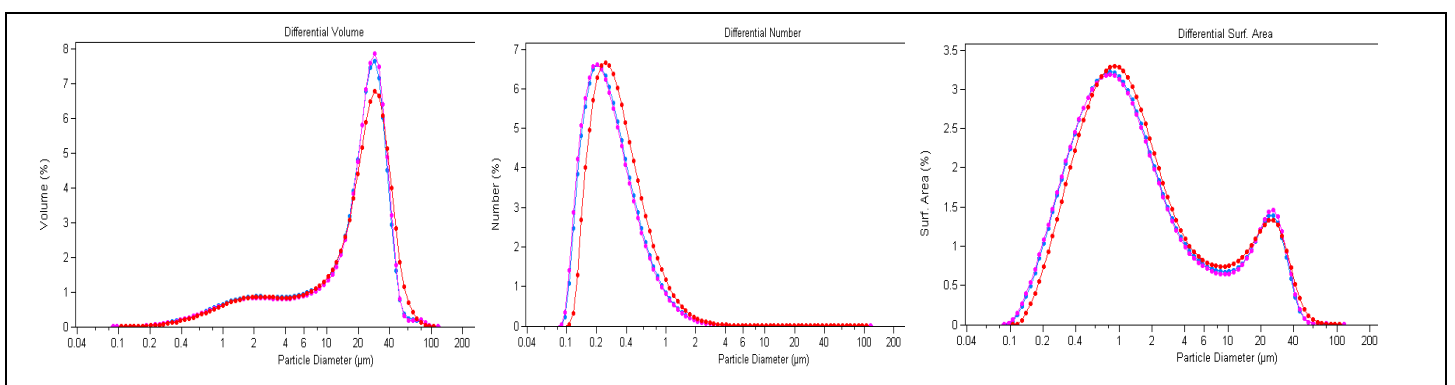


Figura 5.5.- Distribución en volumen de tamaño de gota, expresada en número y en área de gota, de emulsiones preparadas con una concentración 1 mg/mL en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,5 de β -Lg s tt (1) (—), β -Lg c tt 51(2) (—) y β -Lg c tt 96h (3) (—). Las medidas fueron llevadas a cabo en presencia de SDS.

Las emulsiones preparadas con β -Lactoglobulina sin tratamiento térmico, β -Lactoglobulina con tratamiento térmico de 51 horas y β -Lactoglobulina con tratamiento térmico de 96 horas presentaron una distribución tamaño de partícula que abarca el intervalo comprendido entre 0,08 a 110 μm aproximadamente (Figura 5.5). Las distribuciones de tamaño de partícula expresadas tanto en volumen como en superficie, de las emulsiones preparadas con β -Lactoglobulina sin glicosilar, exhibieron un carácter bimodal con dos poblaciones de gotas bien definidas: gotas con diámetro mayor y menor a 10 μm . Este tipo de comportamiento fue observado con anterioridad por Mitidieri y Wagner (2002) y Panizzolo (2005), y fue atribuido al tipo de homogeneizador utilizado (pequeño volumen de muestra y al tiempo de homogeneización relativamente corto), el cual es equivalente al empleado en este trabajo.

Tanto el número de partículas con un diámetro inferior a 10 μm , como el porcentaje de área y volumen que estas ocupan fue equivalente ($\alpha \leq 0,05$) para las emulsiones preparadas con β -Lg s tt, β -Lg c tt 51 y β -Lg c tt 96h (Tabla 5.4). El 75% de la fracción de volumen de aceite de la emulsión correspondió a gotas con diámetro superior a 10 μm , sin embargo se puede apreciar que el 99,99% de las partículas tienen diámetros menores de 10 μm , lo que estaría indicando que entre muy pocas gotas, una proporción menor de 0,01%, se distribuiría la mayoría del volumen de aceite emulsionado (Tabla 5.4). En la misma Tabla se puede apreciar que el mayor porcentaje de área formada, 85%, correspondió a las partículas con diámetro menor de 10 μm en consonancia con la distribución del número de partícula.

Tabla 5.4. Valores promedio de volumen, número de partícula y área correspondiente a gotas con diámetro inferior a 10 μm , de las emulsiones en estudio tratadas con SDS

<i>Muestra</i>	<i>Volumen (0,04-10 μm)</i>	<i>Numero de particula (0,04-10 μm)</i>	<i>Área (0,04-10 μm)</i>
<i>Lg s tt</i>	26,8 \pm 0,6 % a	99,99 %	84 \pm 4 % a
<i>Lg c tt 51h</i>	25,5 \pm 0,7 % a	99,99 %	84 \pm 3 % a
<i>Lg c tt 96h</i>	25,7 \pm 0,6 % a	99,98 %	83 \pm 3 % a
<i>10 51 G</i>	16,5 \pm 0,7 % b	100 %	82 \pm 5 % a
<i>10 96 G</i>	16,0 \pm 0,8 % b	100 %	83 \pm 3 % a
<i>100 51 G</i>	16,2 \pm 0,7 % b	100 %	84 \pm 4 % a
<i>100 96 G</i>	15,4 \pm 0,7 % b	100 %	84 \pm 3 % a
<i>10 51 L</i>	19,6 \pm 0,6 % b	99,99 %	83 \pm 4 % a
<i>10 96 L</i>	15,1 \pm 0,6 % b	100 %	83 \pm 3 % a
<i>100 51 L</i>	14,4 \pm 0,7 % b	100 %	83 \pm 3 % a
<i>100 96L</i>	13,8 \pm 0,8 % b	100 %	84 \pm 3 % a
<i>10 51 D</i>	15,8 \pm 0,6 % b	100 %	80 \pm 4 % a
<i>10 96 D</i>	16,2 \pm 1,0% b	100 %	77 \pm 5 % a
<i>100 51 D</i>	16,5 \pm 0,7 % b	100 %	81 \pm 3 % a
<i>100 96 D</i>	16,0 \pm 0,8 % b	100 %	83 \pm 1% a

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0.05$)

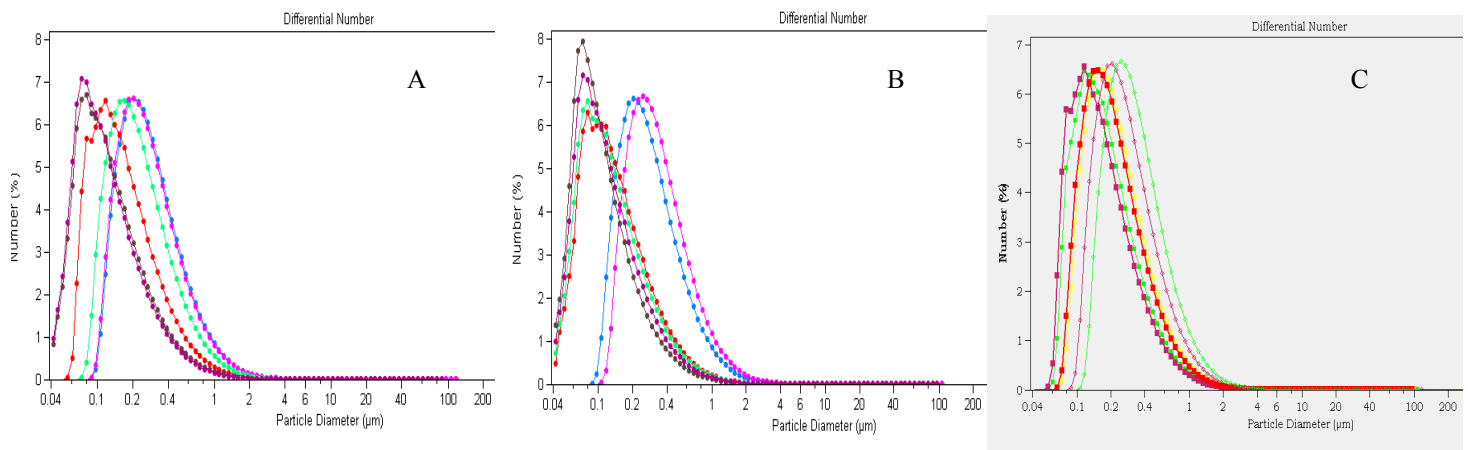


Figura 5.6. Distribución en número de gota de emulsiones preparadas con una concentración de muestra: 1 mg/mL en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,5 en presencia de SDS **A)** β -Lg s tt (—), β -Lg c tt 96h (—), 1:10 96 G (—), 1:100 96 G (—), 1:10 96 L (—), 1:100 96 L (—). **B)** β -Lg s tt (—), β -Lg c tt 51 (—), 1:10 51 G (—), 1:100 51 G (—), 1:10 51 L (—), 1:100 51 L (—) **C)** β -Lg c tt 51 h (—), β -Lg c tt 96h (—), 1:10 51 D (—), 1:100 96 D (—), 1:100 51 D (—), 1:100 96 D (—).

Las curvas de distribución expresadas en número de gota de emulsiones preparadas a pH 7,5 de β -Lactoglobulina glicosiladas con glucosa (A), lactosa (B) y dextrano (C), comparadas con las de β -Lactoglobulina sin glicosilar presentaron un corrimiento significativo hacia valores menores de 0,04 μ m (Figura 5.6).

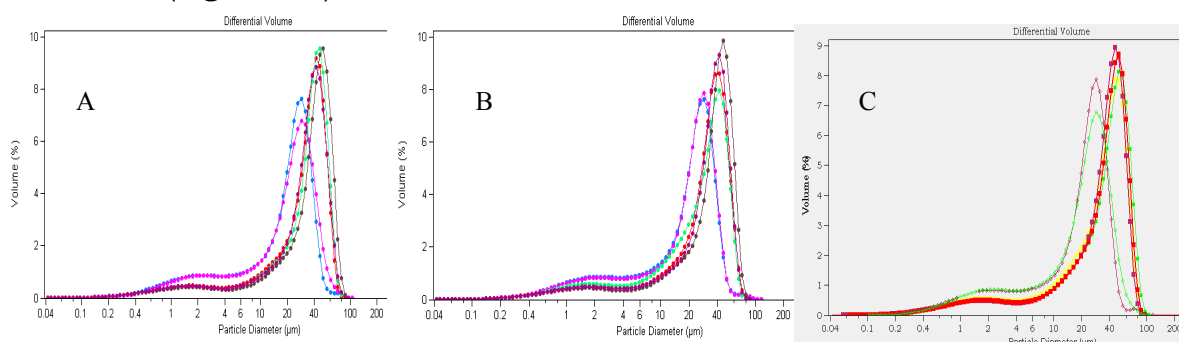


Figura 5.7. Distribución en volumen de gota de emulsiones preparadas con una concentración de muestra: 1 mg/mL en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,5 en presencia de SDS **A)** β -Lg s tt (—), β -Lg c tt 96h (—), 1:10 96 G (—), 1:100 96 G (—), 1:10 96 L (—), 1:100 96 L (—). **B)** β -Lg s tt (—), β -Lg c tt 51 (—), 1:10 51 G (—), 1:100 51 G (—), 1:10 51 L (—), 1:100 51 L (—) **C)** β -Lg c tt 51 h (—), β -Lg c tt 96h (—), 1:10 51 D (—), 1:10 96 D (—), 1:100 51 D (—), 1:100 96 D (—).

Las curvas de distribución de partículas expresadas en volumen de emulsiones preparadas a pH 7,5 para las muestras de β -Lactoglobulina glicosiladas con glucosa (A), lactosa (B) y dextrano (C), comparadas con las muestras sin glicosilar presentaron el máximo desplazado hacia mayores tamaños de partícula (Figura 5.7), disminuyendo el porcentaje de la fracción de volumen de aceite correspondiente a partículas menores de 10 μ m de 25 % a 15% (Tabla 5.4).

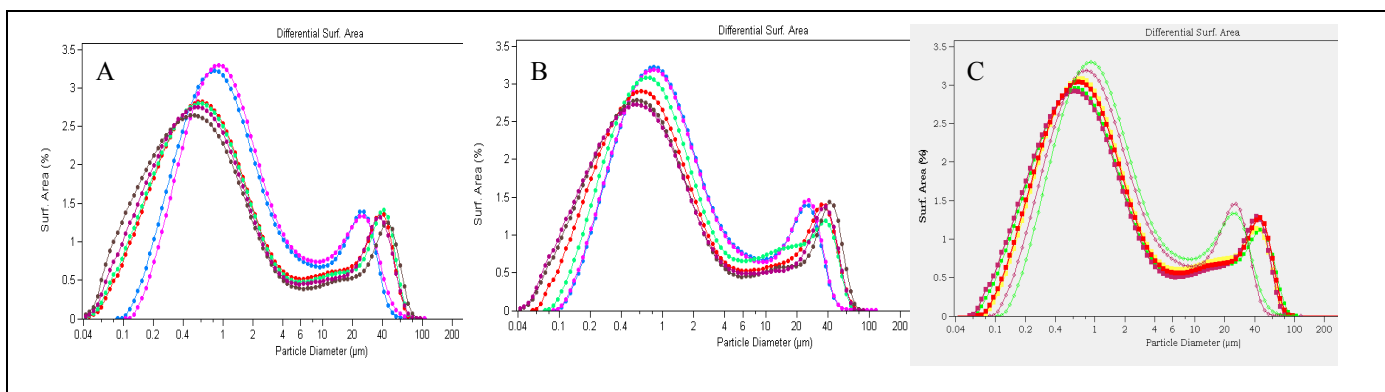


Figura 5.8. Distribución en superficie de gota de emulsiones preparadas con una concentración de muestra: 1 mg/mL en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,5 en presencia de SDS **A)** β -Lg s tt (—), β -Lg c tt 96h (—), 1:10 96 G (—), 1:100 96 G (—), 1:10 96 L (—), 1:100 96 L (—). **B)** β -Lg s tt (—), β -Lg c tt 51 (—), 1:10 51 G (—), 1:100 51 G (—), 1:10 51 L (—), 1:100 51 L (—) **C)** β -Lg c tt 51 h (—), β -Lg c tt 96h (—), 1:10 51 D (—), 1:10 96 D (—), 1:100 51 D (—), 1:100 96 D (—).

En las curvas de distribución de partícula expresadas en superficie de emulsiones de β -Lactoglobulina glicosiladas se puede observar una mayor separación entre los dos poblaciones encontradas que en las muestras de β -Lactoglobulina sin modificar, la población correspondiente a tamaños de partícula menores se desplazó hacia valores más bajos de diámetro, mientras que la población correspondiente a tamaños de partícula mayores se corrió hacia valores más altos (Figura 5.8). Este comportamiento se refleja en el valor

de $D_{3,2}$ correspondiente a las emulsiones de β -Lactoglobulina glicosiladas y sin modificar (Tabla 5.7).

Tabla 5.5. Valores promedio $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ de las emulsiones en estudio en ausencia de SDS

	$D_{3,2}$	$D_{4,3}$
<i>Lg s tt</i>	4,4±0,4 a	19,3±0,9 a
<i>Lg c tt 51h</i>	4,5±0,9 a	27,1±0,7 b
<i>Lg c tt 96h</i>	4,8±0,7a,b	24,5±0,6 b
10 51 G	6,5±0,1 c	37,2±0,6 c
10 96 G	5,6±0,8 c	34,1±0,9 c
100 51 G	6,2±0,4 b,c	39,0±0,9 c
100 96 G	5,5±0,3 b,c	35,1±0,9 c
10 51 L	6,0±0,2 c	33 ± 0,9 c
10 96 L	5,7±0,8 c	33,9±0,9 c
100 51 L	6,1±0,8 c	32,0±0,9 c
100 96L	5,5±0,8 b,c	35,2±0,9 c,d
10 51 D	6,3±0,7 b	35,9±0,8 b
10 96 D	6,6±0,8 b	35,8±0,9 b
100 51 D	6,7±0,8 b	35,0 ±0,9 b
100 96 D	7,1±0,8 b,c	34,6 ± 0,9 b

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0.05$)

Tabla 5.6. Valores promedio $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ de emulsiones en estudio tratadas con SDS

	$D_{3,2}$	$D_{4,3}$
--	-----------	-----------

Lg s tt	4,8±0,4 a	16,9±0,9 a
Lg c tt 51h	5,0±0,2 a,b	21,6±0,9 b
Lg c tt 96h	5,3±0,4 a,b	22,1±0,6 b
10 51 G	6,1±0,1 b,c	30,8±0,6 c
10 96 G	6,1±0,2 b,c	33,1±0,9 c
100 51 G	5,8±0,4 b	31,9±0,9 c
100 96 G	5,7±0,3 b	32,1±0,9 c
10 51 L	5,9±0,2 b	28,2±0,9 b,c
10 96 L	6,3±0,2 c	27,9±0,9 b,c
100 51 L	6,2±0,4 c	31,±0,9 c
100 96L	5,9±0,4b	33,2±0,9 c
10 51 D	6,1±0,1 b,c	32,7±0,6 c
10 96 D	6,5±0,8 c	33,0±0,9 b
100 51 D	6,6±0,8 c	33,9±0,9 c
100 96 D	7,0±0,8 c	33,6±0,9 c

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0.05$)

Tabla 5.7. Valores promedio $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ de las emulsiones en estudio tratadas con SDS, dividida en dos zonas: una de menos de $10\mu\text{m}$ y la otra mayor a $10\mu\text{m}$

	$D_{3,2} (<10\mu\text{m})$	$D_{4,3} (<10\mu\text{m})$	$D_{3,2} (>10\mu\text{m})$	$D_{4,3} (>10\mu\text{m})$
Lg s tt	1,5±0,4a	3,5±0,3a	27±3 a	32±6a
Lg c tt 51h	1,5±0,4a	3,4±0,2a	31±3a,b	34±4 a,b
Lg c tt 96h	1,6±0,4a	3,4±0,1a	32±1a,b	35±1 a,b
10 51 G	1,2±0,1b	3,3±0,1a	30±2a,b	36±1b
10 96 G	1,4±0,3b	3,5±0,1a	30±2a,b	36±2b
100 51 G	1,2±0,1b	3,5±0,1a	31±1a,b	38±1b
100 96 G	1,2±0,4b	3,2±0,1a	33±1b	40±2b
10 51 L	1,1±0,1b	3,3±0,1a	31±1a,b	36±1b
10 96 L	1,2±0,2b	3,4±0,2a	31±3a,b	37±4b
100 51 L	1,1±0,1b	3,2±0,4a	30±1a,b	36±1b
100 96L	0,9±0,1c	3,3±0,1a	31±1a,b	37±1b
10 51 D	1,4±0,4b	3,4±0,2a	31±1a,b	37±2b
10 96 D	1,6±0,3a	3,5±0,1a	29±1a	35±1 a,b
100 51 D	1,4±0,2b	3,4±0,1a	32±1a,b	40±1b
100 96 D	1,3±0,1b	3,4±0,2a	33±1 b	41±2b

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0.05$)

Tabla 5.8. Valores promedio $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ de las emulsiones en estudio en ausencia de SDS, dividida en dos zonas: una de menos de $10\mu\text{m}$ y la otra mayor a $10\mu\text{m}$

	$D_{3,2} (<10\mu m)$	$D_{4,3} (<10\mu m)$	$D_{3,2} (>10\mu m)$	$D_{4,3} (>10\mu m)$
Lg s tt	1,5±0,4a	3,7±0,4a	27±1a	32±6 a
Lg c tt 51h	1,6±0,4a	3,5±0,6a	31±3 a	35±4 a,b
Lg c tt 96h	1,5±0,1a	3,8±0,2a	32±1 a,b	36±1 a,b
10 51 G	1,2±0,2c	3,5±0,6a	30±1 a	36±1 a,b
10 96 G	1,2±0,8c	3,3±0,2a	31±1 a	38±1 b
100 51 G	1,1±0,1c	3,3±0,1a	31±1 a	36±1 a,b
100 96 G	1,4±0,4b	3,6±0,3a	31±1 a	37±1 b
10 51 L	1,4±0,3b	3,6±0,2a	30±2 a	36±2 a,b
10 96 L	1,2±0,3c	3,5±0,2a	33±1 a,b	40±2 c
100 51 L	1,4±0,4b	3,6±0,2a	31±3 a	37±4 b
100 96L	0,9±0,2c	3,2±0,1a	31±1 a	37±1 b
10 51 D	1,3±0,8b	3,4±0,4a	35±3 b	45±8 c
10 96 D	1,3±0,6b	3,3±0,2a	33±2a,b	40±4 c
100 51 D	1,4±0,8b	3,6±0,6a	33±3 a,b	38±1 b
100 96 D	1,3±0,1b	3,3±0,1a	34±2 a,b	42±2 c

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0.05$)

Los valores de $D_{4,3}$ de las emulsiones estudiadas fueron significativamente mayores que los valores $D_{3,2}$ (Tablas 5.5, 5.6, 5.7 y 5.8), ello denota que las emulsiones obtenidas son polidispersas. Este fenómeno es más significativo cuanto mayor es el incremento de $D_{4,3}$ con respecto a $D_{3,2}$ (Walstra, 1983). En la Figura 5.6 correspondiente a la Distribución en número de gota de emulsiones preparadas con las muestras de β -Lactoglobulina glicosiladas con glucosa, lactosa y dextrano, se puede observar que la amplitud del intervalo de tamaño de partícula aumentó respecto a la β -Lactoglobulina sin glicosilar, abarcando aproximadamente desde 0,04 a 200 μm . Es posible observar que al igual que las emulsiones obtenidas con β -Lactoglobulina sin glicosilar, las correspondientes a los compuestos glicosilados también presentaron una distribución bimodal. En las emulsiones obtenidas con β -Lactoglobulina glicosiladas con glucosa, lactosa y dextrano un 0,05% de las gotas de diámetros superiores a 10 μm se distribuyen el 80% del volumen de aceite emulsionado. Este número de partículas inferior al equivalente de las emulsiones obtenidas con β -Lactoglobulina sin glicosilar se distribuyeron un volumen de aceite emulsionado mayor que aquellas ($\alpha \leq 0,05$) (Tabla 5.4).

Las muestras glicosiladas presentaron un aumento significativo en los valores de $D_{3,2}$ (Tablas 5.5 y 5.6) respecto de las muestras nativas, no encontrándose diferencias significativas entre las distintas muestras de β -

Lactoglobulina glicosiladas con lactosa, glucosa y dextrano. Sin embargo, los valores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ correspondientes a los intervalos por encima y debajo de $10\mu\text{m}$ mostraron un comportamiento diferente. Para las muestras glicosiladas el $D_{3,2}$, con y sin SDS, correspondiente a la zona de diámetros inferiores a $10\mu\text{m}$ fue significativamente menor ($\alpha \leq 0,05$) que el correspondiente a la β -Lactoglobulina sin glicosilar. En cambio, para la zona de partícula con diámetros mayores a $10\mu\text{m}$ el comportamiento detectado fue el inverso, los valores de $D_{3,2}$ de las muestras de β -Lactoglobulina glicosiladas fue superior al correspondiente a la β -Lactoglobulina nativa.

El tamaño de las gotas producidas durante la formación de emulsiones depende de dos procesos: 1) la generación de gotas de pequeño tamaño y 2) la rápida estabilización de estas gotas lo que evita su coalescencia una vez formadas. Es decir que el tamaño final de las gotas resulta del balance entre dos procesos físicos opuestos: ruptura y coalescencia de gotas (Figura 5.10). Estos procesos a su vez dependen del balance entre el tiempo que necesita un emulgente para adsorberse en la superficie de la gota ($\tau_{\text{adsorción}}$) (generación de la gota) y el tiempo de colisión entre dos gotas ($\tau_{\text{colisión}}$) que permite la coalescencia de las gotas si no existe una buena estabilización (Mc Clements, 1999).

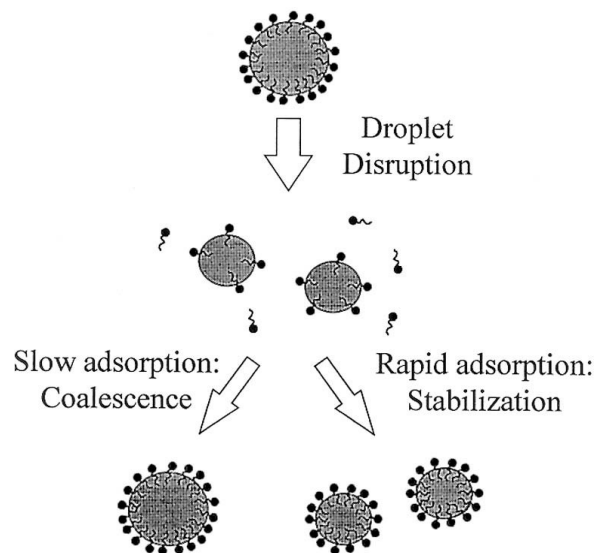


Figura 5.9. El tamaño de las gotas producidas durante la homogeneización depende del balance entre el tiempo para que un emulgente se adsorba en la superficie de la gota ($\tau_{\text{adsorción}}$) (generación de la gota) y el tiempo de colisión entre dos gotas ($\tau_{\text{colisión}}$). (Tomado de Mc Clements, 1999).

La naturaleza precisa de los procesos físicos que ocurren durante la formación de la emulsión depende del tipo de homogeneizador usado. Sin embargo, existen algunos aspectos comunes de la ruptura de gotas que se

pueden aplicar a la mayoría de los homogenizadores. El estado inicial de la homogeneización incluye la ruptura e incorporación de las fases oleosa y acuosa a través de gotas bastantes grandes de un líquido dentro del otro líquido. La última etapa de la homogeneización incluye la ruptura de las gotas grandes en otras más pequeñas. Es entonces importante entender la naturaleza de las fuerzas responsables de la ruptura de gotas durante la homogeneización. La existencia o no de ruptura de gotas esta determinada por el balance entre fuerzas interfaciales, las cuales tienden a mantener las gotas íntegras, y las fuerzas de ruptura generadas por el homogenizador, las cuales tienden a romperlas (Walstra, 1983, 1993). Los emulsificantes tienen una función importante en la ruptura de gotas. La facilidad con la cual una gota puede ser rota durante la homogeneización se incrementa cuanto más bajo es el valor de la tensión interfacial. Otro factor que además influye es la velocidad con la cual el emulsificante se adsorbe en la interfase de las gotas durante la homogeneización (Walstra, 1983). Inmediatamente después de la formación de las gotas, éstas tienen una baja concentración de emulgente adsorbido en su superficie, lo cual dificulta la ruptura porque la tensión interfacial es relativamente alta. Con el tiempo una mayor cantidad de emulgente se acumula en la superficie lo cual disminuye la tensión interfacial y facilita la ruptura de las gotas. Por ello, cuanto más rápidamente se adsorba el emulgente sobre la superficie de las gotas durante la homogeneización menor será el tamaño de las gotas producidas.

Las emulsiones son sistemas altamente dinámicos en los cuales las gotas se mueven continuamente y frecuentemente colisionan entre sí. La colisión entre gotas es particularmente rápida durante la homogeneización debido a la intensa agitación mecánica de la emulsión. Si las gotas no están bien protegidas por una membrana de emulgente suficientemente fuerte tienden a coalescer durante la colisión (Walstra, 1993). Inmediatamente después de la ruptura de la gota de una emulsión existe una cantidad de emulsificante insuficiente para cubrir completamente la nueva superficie formada y entonces las nuevas gotas probablemente coalescan con sus vecinas.

La importancia de la cinética de adsorción del emulgente sobre el tamaño de gotas producido durante la homogeneización ha sido demostrado experimentalmente (Schubert y Armbruster, 1992). Bajo las mismas condiciones de homogeneización se ha demostrado que emulgentes que se

adsorben rápidamente producen tamaño de gotas más pequeños que otros que se adsorben más lentamente. Muchos emulgentes alimentarios no se adsorben con suficiente rapidez para prevenir completamente la coalescencia de gotas y entonces el tamaño de gota obtenido durante la homogenización es grande con respecto al que teóricamente podría ser obtenido. La tendencia de las gotas a coalescer durante la homogenización depende además de la efectividad de la membrana interfacial a resistir la coalescencia durante la colisión de gotas. Esta resistencia depende de la concentración de moléculas de emulgente presente así como de su estructura y propiedades fisicoquímicas (dimensión, carga eléctrica, empaquetado, interacciones).

Las soluciones proteicas elaboradas con β -Lactoglobulina glicosiladas con gluosa, lactosa y dextrano no presentaron diferencias significativas en la velocidad de absorción en la interfase respecto a las muestras de β -Lactoglobulina sin modificar. Por lo tanto el menor tamaño de gota de las emulsiones elaboradas con β -Lactoglobulina glicosilada se podría atribuir principalmente a la resistencia de la membrana interfacial a la coalescencia. Esta resistencia de la interfase creada por las proteínas glicosiladas respecto a la β -Lactoglobulina nativa, esta relacionada con la mayor concentración de proteína en la interfase, mayor interacción proteica debido a la formación de polímeros y aumento en la repulsión estérica factores que favorecen la estabilidad de las emulsiones formadas con los compuestos glicosilados.

5.3.1.3 Floculación de gotas durante la formación de la emulsión

La adición de SDS, según Anton y col. (2002), permite la disociación de cualquier forma de agregado presente en la emulsiones que estuviera estabilizado por interacciones $GF_{(covalentes)}$. Como consecuencia $GF_{(total)}$ de los

Muestra	$GF_{(covalentes)}$	$GF_{(total)}$	$GF_{(total)}$
Lg s tt	5 ± 4	0 ± 4	14 ± 2
Lg c tt 51h	2 ± 4	2 ± 4	25 ± 2
Lg c tt 96h	10 ± 4	3 ± 4	11 ± 2
10 51 G	4 ± 4	0 ± 4	21 ± 3
10 96 G	4 ± 4	5 ± 4	3 ± 1
100 51 G	2 ± 4	7 ± 4	9 ± 2
100 96 G	2 ± 4	7 ± 4	9 ± 2
10 51 L	4 ± 4	0 ± 4	17 ± 3
10 96 L	9 ± 4	8 ± 4	22 ± 2
100 51 L	5 ± 4	3 ± 4	3 ± 2
100 96 L	3 ± 4	0 ± 4	6 ± 3
10 51 D	2 ± 4	21 ± 4	9 ± 1
10 96 D	4 ± 4	13 ± 4	8 ± 1
100 51 D	3 ± 4	5 ± 4	3 ± 1
100 96 D	3 ± 4	3 ± 4	3 ± 1

Tabla 5.9 Valores promedio de floculación de las emulsiones en estudio

Respecto al GF total, se puede observar que de todas las emulsiones estudiadas las preparadas con β -Lactoglobulina glicosilada con dextrano son las que presentaron el menor grado de floculación, en particular para la relación molar 1:100. Esta mayor estabilidad frente a la floculación en función de la relación molar mayor también se puede observar en las muestras modificadas con lactosa. En el caso en que la reacción de glicosilación se llevó a cabo con glucosa el mayor grado de floculación se detectó en las muestras tratadas durante 51 h.

Si se determina el grado de floculación correspondiente a los intervalos de partículas con diámetros por encima y por debajo de 10 μm se puede apreciar un comportamiento diferente, debido al carácter bimodal encontrado en estas emulsiones. Las gotas mayores a 10 μm presentaron un GF significativamente mayor que las gotas de tamaño menor a 10 μm .

En el caso de las emulsiones obtenidas con β -Lactoglobulina glicosilada tanto las gotas con diámetros menores a 10 μm como las más grandes presentaron una disminución significativa ($\alpha \leq 0,05$) en el GF, respecto a las emulsiones obtenidas con β -Lactoglobulina nativa. Este comportamiento estaría relacionado con los cambios conformacionales provocados por la unión de los carbohidratos a la β -Lactoglobulina. La unión de los carbohidratos aumenta la repulsión estérica, provoca un desplegamiento de la β -

Lactoglobulina y probablemente, según Morgan y col. (1999a), induciría una polimerización mediada por puentes disulfuro y enlaces covalentes de otra naturaleza entre los monómeros y los carbohidratos formando así una película interfacial más flexible que impediría la floculación debida a las colisiones de las gotas durante la formación de la emulsión.

5.3.2.- Estabilidad de emulsiones

La estabilidad de una emulsión se refiere a la capacidad de resistir a los cambios en sus propiedades con en el tiempo. Al considerar la estabilidad de una emulsión, es muy importante distinguir entre la estabilidad termodinámica y la cinética. La estabilidad termodinámica indica si un determinado proceso se llevará a cabo o no, mientras que la cinética nos indica la velocidad a la que el proceso ocurre (Dickinson, 1992b).

5.3.2.1 Estabilidad de las emulsiones frente al cremado

En la Figura 5.10 se muestran los perfiles de retrodispersión (RD) en función de la altura del tubo de muestra correspondiente a una emulsión preparada con β -Lactoglobulina sin tratamiento térmico. Un perfil equivalente se ha obtenido para el resto de las muestras estudiadas. En la zona inferior del tubo de muestra, zona I (10 – 20 mm), se observa una disminución de los valores de RD con el transcurso del tiempo, que evidencia el desarrollo de un proceso de cremado, mientras que en la zona II se puede apreciar la fase crema formada, que permaneció aún después que se acumularan las gotas de aceite en la parte superior del tubo.

Para estudiar la estabilidad de las emulsiones obtenidas frente al cremado se analizó la disminución de los valores promedio de la retrodispersión en la parte inferior (zona 10-20 mm, RDp10-20) del tubo de medida en función del tiempo. Las curvas de variación de los valores promedio de RD (RDp) en la zona 10-20 mm (RDp10-20) en función del tiempo correspondientes a todas las emulsiones ensayadas se presentan en las (Figuras 5.11, 5.12 y 5.13).

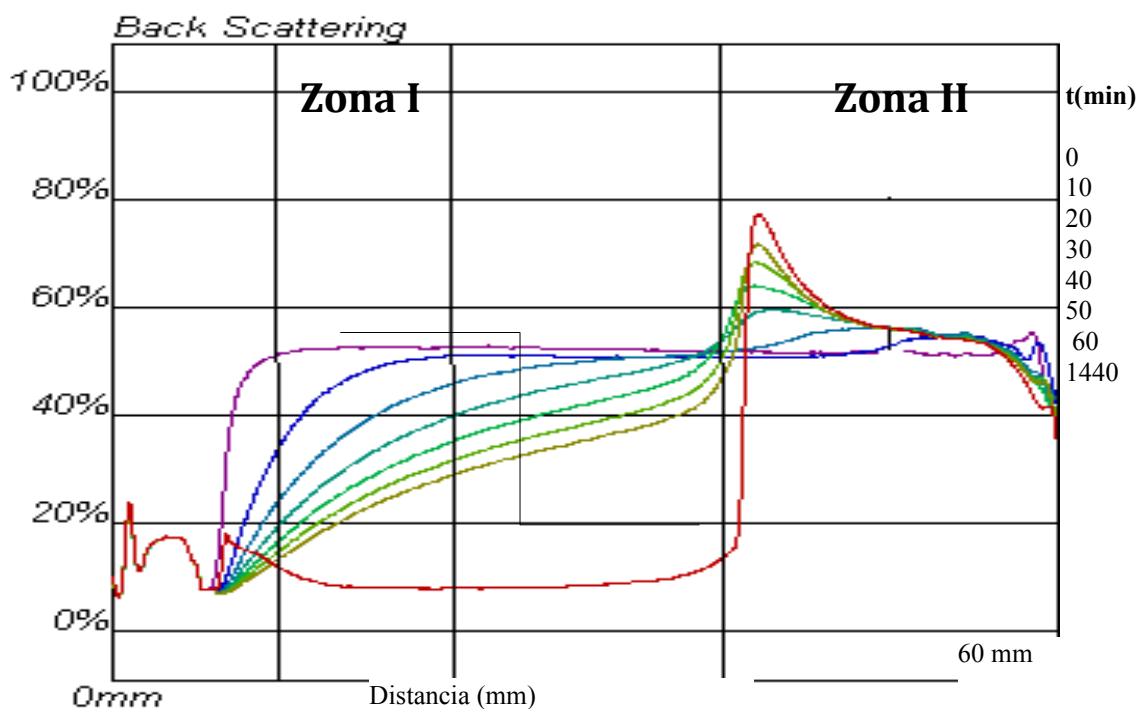


Figura 5.10. Perfil de retrodispersión (RD) en función de la altura del tubo para emulsiones aceite en agua de β -lactoglobulina sin tratamiento térmico concentración 1 mg/mL, pH 7,5 fracción volumétrica de aceite 25%. Las flechas indican el cambio de perfil con el tiempo. El tiempo está representado en la escala a la derecha.

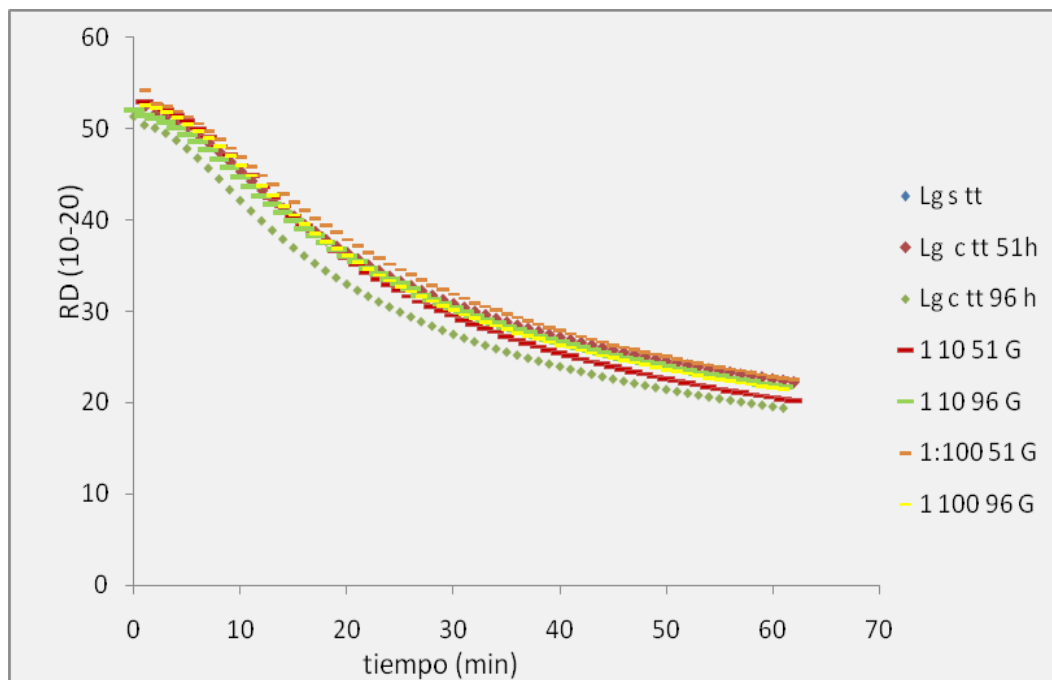


Figure 5.11 Variación de valores promedio de retrodispersión en la zona 10-20 mm (RD_{p10-20}) en función del tiempo de emulsiones preparadas con Lg s tt, Lg c tt 51 h, Lg c tt 96h, 1 10 51 G, 1 10 96 G, 1 100 51 G, 1 100 96 G

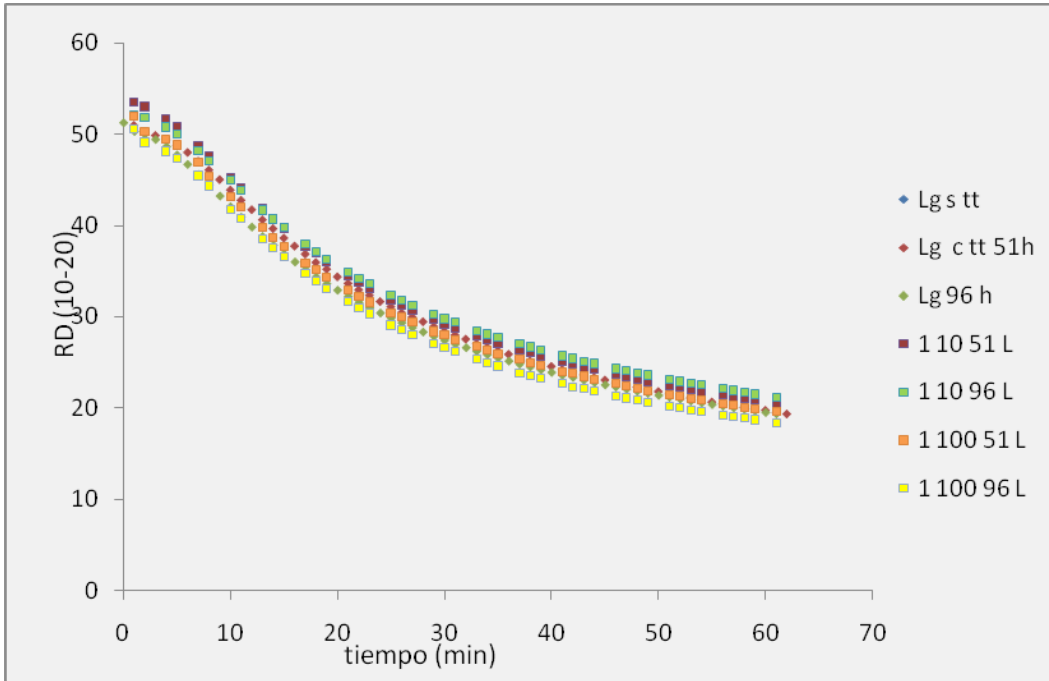


Figure 5.12 Variación de valores promedio de retrodispersión en la zona 10-20 mm (RD_{p10-20}) en función del tiempo de emulsiones preparadas con Lg s tt, Lg c tt 51 h, Lg c tt 96 h, 1 10 51 L, 1 10 96 L, 1 100 51 L, 1 100 96 L

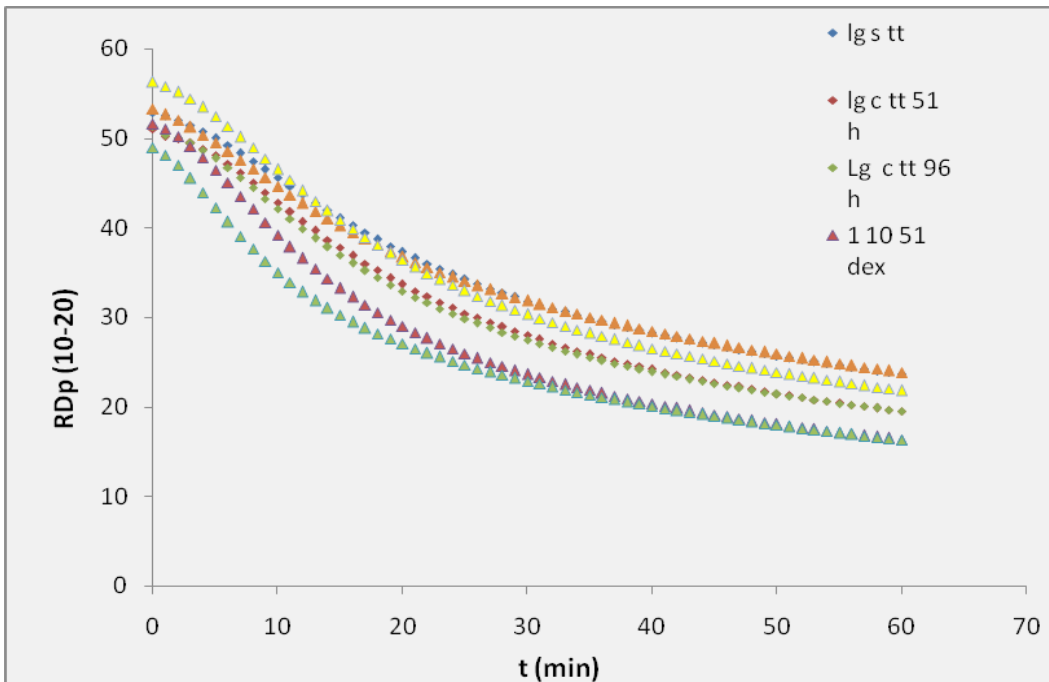


Figure 5.13 Variación de valores promedio de retrodispersión en la zona 10-20 mm (RD_{p10-20}) en función del tiempo de emulsiones preparadas con Lg s tt, Lg c tt 51 h, Lg c tt 96 h, 1 10 51 D, 1 10 96 L, 1 100 51 L, 1 100 96 L

Se puede constatar que todas las curvas obtenidas de RD en función del tiempo presentan una forma de tipo sigmoidea. Según lo planteado por

Panizzolo (2005), los perfiles de RD de naturaleza sigmoidea pueden ajustarse a una ecuación con dos parámetros que responde a la siguiente expresión:

$$RD(t) = \frac{(RD_h)}{RD_h K_h t + 1} + \frac{2^2 RD_s}{2^2 + (RD_s k_s)^2 t^2} \quad (2.34)$$

Donde $RD(t)$ es el valor de RD a tiempo t , K_h es la constante de velocidad de variación de RD en función del tiempo para una cinética de tipo hiperbólico, k_s es la constante de velocidad de variación de RD en función del tiempo para una cinética de tipo sigmoideo y RD_h y RD_s son los parámetros de amplitud correspondientes a las cinéticas hiperbolicas y sigmoideas respectivamente, tales que $RD_h + RD_s = RD_i$.

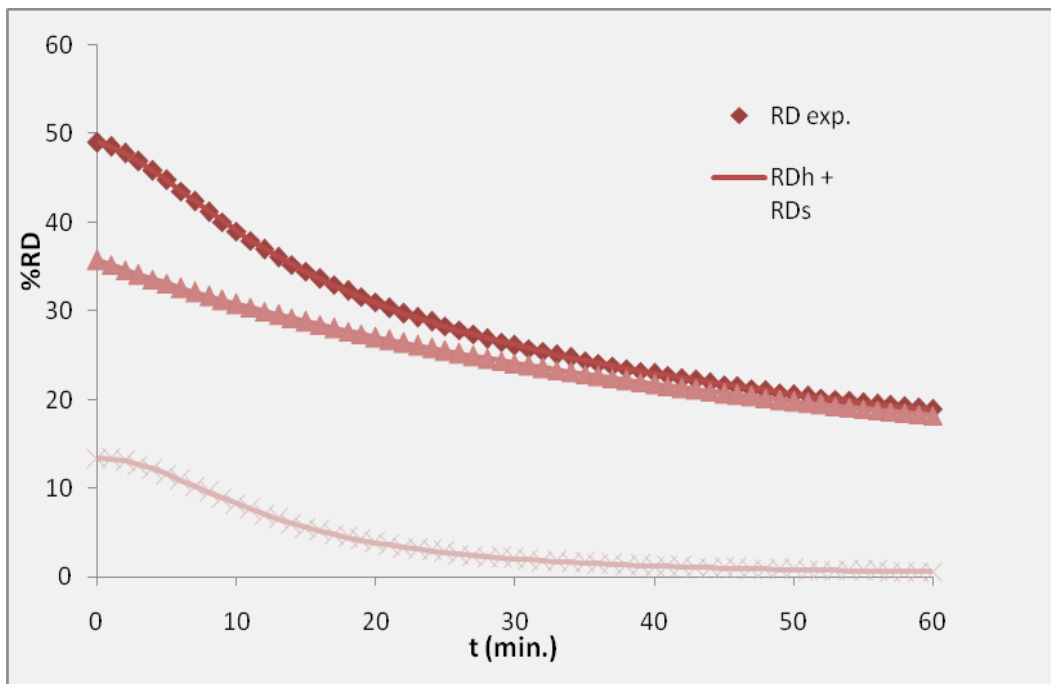


Figure 5.14 Variación de valores promedio y parámetros sigmoideo e hiperbólico de retrodispersión en la zona 10-20 mm (RD_{p10-20}) en función del tiempo de emulsiones preparadas con β -Lg s tt.

Los valores iniciales de RD que corresponden a la cinética sigmoidea descienden acusadamente su contribución al valor de RD total, haciéndose casi cero alrededor de los 30 min, mientras que la componente hiperbólica disminuye paulatinamente y aumenta con el tiempo su contribución al valor de RD total, siendo casi total luego de 30 min (Figura 5.14). Por tanto es

adecuado asociar las gotas de mayor tamaño a la variación de RD con cinética sigmoidea. Los valores iniciales de RD que corresponden a la cinética hiperbólica son casi el doble de los correspondientes a la cinética sigmoidea (Figura 5.14). Como ya se indicó RD depende de la cantidad y del número de partículas de la fase dispersa, en este estudio el mayor número de partículas correspondió a las gotas con diámetros menores a 10 μm . Entonces sería apropiado vincular las gotas de menor tamaño a la variación de RD con cinética hiperbólica.

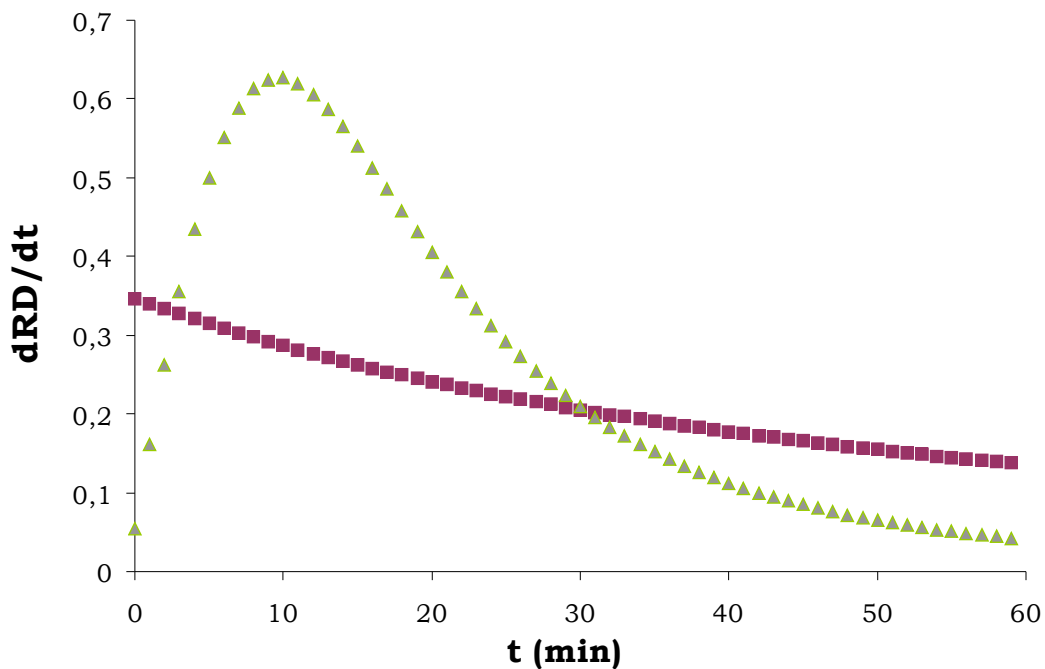


Figure 5.15 Representación de la derivada de retrodispersion en función del tiempo (dRD/dt) correspondientes a las cinéticas sigmoidea () e hiperbólica () de emulsiones preparadas con Lg_{st} (proteína)= 1 mg/mL, pH 7,5

La velocidad de variación de RD con respecto al tiempo se puede asociar a la velocidad del proceso de cremado (Panizzolo, 2005). Para el caso de la cinética de comportamiento hiperbólico la expresión que la representa es:

$$dRD/dt = (k_h RD^2)/(1 + k_h RDt)^2$$

y a la cinética de comportamiento sigmoideo le corresponde la ecuación:

$$dRD/dt = (2^2 \cdot k_s^2 \cdot R D^{2+1} \cdot t) / [2^2 + (k_s \cdot RD)^2 \cdot t^2]^2$$

La representación de la derivada de la retrodispersión en función del tiempo (dRD/dt) correspondiente a las cinéticas sigmoidea e hiperbólica de emulsiones preparadas con Lg s tt se muestra en la Figura 5.15. En ella se puede observar que la cinética hiperbólica presentó un comportamiento tal que la velocidad fue máxima al comienzo y luego fue disminuyendo, en cambio en la cinética sigmoidea la velocidad de cremado se incrementó hasta un un tiempo dado, alcanzando un máximo, y luego disminuyó de forma similar a la presentada por la cinética hiperbólica. Tal como lo señala Panizzolo (2005) en el caso de la cinética hiperbólica las desviaciones a la Ley de Stokes serían tales que si bien afectan la velocidad de cremado de las gotas, éstas lo harían de manera de mantener la tendencia esperada donde las gotas de mayor tamaño creman más rápidamente que las de menor tamaño. Por tanto k_h se podría asimilar a una constante de velocidad que describe el proceso de cremado y sus valores estarían indicando el comportamiento de las emulsiones con respecto a la estabilidad. En cambio en la cinética sigmoidea la magnitud e incidencia de las desviaciones a la Ley de Stokes serían tales que las gotas de mayor tamaño tendrían impedido el movimiento en el primer intervalo del proceso de cremado, pero con el transcurso del tiempo los efectos retardadores del proceso disminuirían su magnitud e incidencia de modo que la velocidad de cremado pasaría a tener un comportamiento similar al de las emulsiones de perfil de tipo hiperbólico. Por consiguiente, k_s es un índice del efecto de retardo en la velocidad de cremado.

Todas las emulsiones preparadas con β -Lactoglobulina glicosiladas y sin glicosilar presentaron comportamiento sigmoideo en la cinética de cremado. Dicho comportamiento se debería al movimiento simultáneo de las dos poblaciones de gotas encontradas en estas emulsiones, las gotas menores de diámetro entre $0,04 \mu\text{m}$ y $10 \mu\text{m}$ y las mayores a $10 \mu\text{m}$ con un intervalo entre $10 \mu\text{m}$ a $110 \mu\text{m}$. Una de estas poblaciones tendría un perfil hiperbólico y las otras un perfil sigmoideo. Dado que el 99,99% de las partículas tienen diámetros menores de $10 \mu\text{m}$ es apropiado vincular las mismas a la variación de RD con cinética hiperbólica. Las gotas pequeñas no tendrían impedido el movimiento, por el contrario su disminución es continua y lenta dado el alto porcentaje de partículas comprendido en este intervalo de tamaño. En cambio las gotas de mayor tamaño que presentaron un GF significativamente más alto, podrían estar formando flóculos en estructura de red abierta y tendrían

impedido el movimiento en el primer intervalo del proceso de cremado. Una vez que los flóculos pasaron esa barrera estarían liberados aumentando la velocidad de cremado hasta un máximo en el cual nuevamente disminuiría la velocidad debido a que el número de partículas de este intervalo disminuye hasta llegar a 0.

Otra razón posible de este comportamiento sería la concentración de gotas. Cuanto mayor es la concentración de gotas y más polidispersa más acentuada es la disminución de la velocidad de cremado hasta tal punto que el cremado puede ser completamente inhibido cuando se excede un determinado valor de Φ_c . En general el valor de Φ_c depende del ordenamiento de las gotas en el seno de la emulsión la cual es determinada por su polidispersión e interacciones coloidales (Mc Clements, 1999). En el caso de las emulsiones de β -Lactoglobulinas glicosiladas y sin glicosilar, las gotas de mayor tamaño que se encuentran en menor número, serían las que tenderían a moverse más rápido y antes, sin embargo tendrían impedido el movimiento en las primeras etapas del proceso de cremado debido a la presencia de una gran cantidad de partículas de menor tamaño con una velocidad de cremado mucho menor. De todos modos el conjunto de gotas tendería a un movimiento ascendente permitiendo que poco a poco se fuera descongestionando el sistema y que la población de gotas de mayor tamaño fuera aumentando su velocidad (Figura 5.15). Luego que el efecto retardador de la población de gotas de menor tamaño fuera superado las gotas de mayor tamaño tendrían un comportamiento cinético acorde con la Ley de Stokes.

Los parámetros de amplitud hiperbólica y sigmoidea de las emulsiones de β -Lactoglobulina sin glicosilar y glicosiladas no presentaron diferencias significativas. Las muestras de β -Lg s tt, β -Lg c tt 51h y β -Lg c tt 96 h no presentaron diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) en los valores de las constantes cinéticas k_h y k_s .

Todas las emulsiones preparadas con β -Lactoglobulinas glicosiladas con glucosa, lactosa y dextrano presentaron una disminución significativa ($\alpha \leq 0,05$) en los valores de las constantes K_h y K_s respecto a los valores obtenidos para las muestras de β -Lactoglobulina sin glicosilar. La constante cinética k_h disminuyó en las muestras glicosiladas con glucosa y lactosa con el aumento del tiempo de reacción y de la relación molar. En el caso de la modificación con dextrano este efecto de retardo del cremado solo se constató al aumentar la relación molar utilizada. La constante cinética K_s no presentó diferencias

significativas entre las muestras glicosiladas con glucosa, lactosa y dextrano (Tabla 5.10).

Tabla 5.10. Constantes cinéticas hiperbólica (k_h) y sigmoidea (k_s) y parámetros de amplitud RD_h y RD_s para las emulsiones formadas con las proteínas en estudio.

	K_h (*104)	RD_h	K_s (*103)	RD_s
Lg s tt	4,1 ± 0,1 a	34 ± 1 a	8,6 ± 0,2 a	16 ± 2 a
Lg c tt 51h	3,9 ± 0,3 a	32 ± 2 a	8,9 ± 0,1 a	16 ± 3 a
Lg c tt 96h	3,5 ± 0,5 a,b	35 ± 3 a	8,9 ± 0,3 a	16 ± 3 a
10 51 G	3,7 ± 0,6 a	32 ± 2 a	6,2 ± 0,1 c	19 ± 2 a
10 96 G	3,4 ± 0,3 b	34 ± 1 a	7,2 ± 0,3 c	16 ± 2 a
100 51 G	2,9 ± 0,3 c	35 ± 1 a	6,5 ± 0,7 c	17 ± 1 a
100 96 G	2,4 ± 0,2 d	29 ± 2 a	6,1 ± 0,2 c	24 ± 2 a
10 51 L	3,6 ± 0,3 a,b	32 ± 1 a	6,7 ± 0,3 c	21 ± 2 a
10 96 L	3,4 ± 0,3 b	33 ± 2 a	6,4 ± 0,1 c	19 ± 1 a
100 51 L	3,2 ± 0,5 c	34 ± 3 a	6,5 ± 0,3 c	16 ± 3 a
100 96 L	3,2 ± 0,3 c	31 ± 1 a	6,4 ± 0,3 c	17 ± 2 a
10 51 D	3,9 ± 0,1 a	29 ± 1 a	7,9 ± 0,2 b	22 ± 4 a
10 96 D	4,0 ± 0,1 a	33 ± 2 a	6,9 ± 0,4 c	16 ± 1 a
100 51 D	3,1 ± 0,4 c	34 ± 2 a	6,3 ± 0,2 c	20 ± 3 a
100 96 D	3,2 ± 0,1 c	34 ± 5 a	7,0 ± 0,3 c	16 ± 3 a

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0,05$)

Para poder evaluar el retardo del proceso de cremado de las emulsiones de β -Lactoglobulinas glicosiladas se tomaron en cuenta las desviaciones en la velocidad de dicho proceso con respecto a la predicha por la Ley de Stokes (Capítulo 1).

- Una de estas desviaciones es el movimiento Browniano, pero ya fue indicado que su influencia es despreciable dado que el radio de las partículas obtenidas en este estudio fue mayor de 25 nm (0,025 μ m).

- La β -Lactoglobulina posee un pI alejado del pH 7,5, al cual se prepararon las emulsiones ensayadas, por lo cual es de esperar que las proteínas presenten carga superficial neta. El grupo amino libre de la Lys tiene un pKa de 10,5 por consiguiente al pH de la reacción de glicosilación se encuentra cargado positivamente, por lo que dependiendo del grado de glicosilación la β -Lactoglobulina se puede encontrar menos cargada o sus grupos cargados más o menos expuestos dependiendo de la conformación que adopten las proteínas glicosiladas. Estos cambios estructurales afectan la

estabilidad de la emulsión dado que las gotas cargadas tienden a moverse más lentamente que las gotas no cargadas por dos razones (Dickinson y Stainsby, 1982; Walstra 1996a). Primero, la existencia de mayor repulsión electrostática entre las gotas igualmente cargadas impide su acercamiento, por lo tanto a medida que las gotas se mueven hacia arriba existe una gran probabilidad de que sus vecinas sean atrapadas en el flujo descendente de la fase continua. Segundo, la nube de contraiones que rodea a la gota se mueve más lentamente que la propia gota causando un desbalance en la carga eléctrica que se opone al movimiento de la gota.

- Otro factor a tener en cuenta dentro de las desviaciones a la Ley de Stokes es el aumento en la densidad efectiva de la fase dispersa por la presencia de la película de moléculas de emulsificante adsorbida en la superficie de la gota. Típicamente el espesor de una capa de proteínas adsorbida se encuentra entre 2-10 nm por lo que este efecto es significativo solamente para gotas muy pequeñas ($<0,1\mu\text{m}$). Cuando las gotas están rodeadas por una película adsorbida se puede calcular la densidad efectiva de la fase dispersa asumiendo que el espesor de la película adsorbida es mucho menor que el radio de las gotas ($\delta \ll r$), usando la siguiente ecuación:

$$\rho_2 = (\rho_{\text{gota}} + 3(\delta/r)\rho_{\text{película}})/(1 + 3(\delta/r)) \quad (5.20)$$

La densidad de la película de emulsificante es comúnmente mayor que la de las fases continua y dispersa y por tanto la adsorción de emulsificante aumenta la densidad efectiva de la fase dispersa (Tan, 1990). La densidad de gotas grandes ($r \gg \delta$) es aproximadamente la misma que la de la fase dispersa pero la de las gotas pequeñas puede ser alterada significativamente. Entonces es posible retardar el cremado en el caso de β -Lactoglobulina glicosilada con carbohidratos, principalmente con dextrano, ya que posee mayor tamaño molecular y una mayor concentración interfacial, modificando la densidad de la película interfacial.

- La velocidad de cremado también puede ser retrasada por la formación de flóculos con estructura de red abierta. Palazolo y col. (2004) informaron que emulsiones preparadas con aislado (DSI) y suero (DWSP) de proteína de soja desnaturalizados térmicamente presentaron flóculos con estructura de red abierta lo que reducía el cremado en comparación con las emulsiones formuladas con las fracciones nativas. Las muestras glicosiladas

que presentan flóculos, podrían formar una estructura de red abierta siendo esta otra posible causa del retraso de la velocidad de cremado observada. Sin embargo cabe recordar que las emulsiones glicosiladas con dextrano y lactosa recién preparadas presentan un grado de floculación muy bajo (Tabla 5.9). Según Palazolo y col. (2004) aunque los flóculos existan en condiciones estáticas, son inestables bajo las condiciones de medida de tamaño de gota (alta dilución y flujo turbulento), en especial cuando se trata de emulsiones preparadas con fracciones volumétricas bajas o intermedias ($\phi = 0,25$) y concentraciones de proteínas bajas (1 mg/mL). No se descarta la formación de flóculos aunque estos no hayan sido detectados experimentalmente. Cuando existe una fuerte atracción entre las gotas, tienden a formarse flóculos de estructura de red abierta (Mc Clements, 1999) debido a que las gotas se adhieren firmemente al punto donde ellas primero se pusieron en contacto y son incapaces de experimentar un reordenamiento estructural posterior (Bremer, 1992).

Las imágenes microfotográficas mostradas en la Figura 5.19 podrían indicar la presencia de flóculos en las emulsiones preparadas con β -Lactoglobulina glicosiladas y esto ser una de las causas que provocan la disminución del proceso de cremado.

5.3.2.2 Estabilidad de la emulsión frente a la floculación y coalescencia

En la zona indicada como II de la Figura 5.10 se puede apreciar la fase crema que permaneció después que las gotas de aceite se acumularon en la parte superior del tubo. Para comparar las fases crema de las diversas emulsiones ensayadas, los perfiles de RD vs la altura del tubo, que se muestran en la Figura 5.9, fueron divididos en las zonas A, B y C, correspondientes respectivamente a las partes baja, media y alta de la fase crema. El perfil de todas las emulsiones, representativas de las distintas condiciones estudiadas, presenta un pico en la zona A, atribuido a la acumulación de gotas pequeñas con baja velocidad de cremado (Palazolo y col., 2005). En la zona C aparece otro pico notorio como resultado de la presencia de espuma en las emulsiones. Para analizar el proceso de coalescencia en la fase crema, es necesario reducir al mínimo la incidencia de los procesos de acumulación de gotas minúsculas y de burbujas de aire, por lo tanto, en la zona media (B) de la fase crema, una caída en el perfil de RD puede ser considerado como la disminución del número de gotas, generada

principalmente por coalescencia o por coalescencia más un proceso de floculación (Palazolo y col., 2005).

Aunque la migración de las gotas debido al cremado puede existir, este proceso debe estar reducido al mínimo por la alta viscosidad de la fase crema (Mc Clements, 1999). Cuando las emulsiones están preparadas con proteínas como único agente emulsionante, en bajas concentraciones y condiciones estáticas (Britten y Giroux, 1991), la coalescencia es un mecanismo de desestabilización lento en comparación con el cremado y la floculación. Por lo tanto un almacenamiento de las emulsiones bajo condiciones estáticas, a temperatura ambiente y por 24 h, se considera tiempo suficiente para detectar coalescencia (Palazolo y col., 2005).

5.3.2.3 Cinética de desestabilización en la fase crema.

Para analizar la cinética de desestabilización en la fase crema, se registró la variación de los valores RD_p de la zona B (50-53 mm), obtenidos de los perfiles del RD, en función del tiempo (0 – 60 minutos) para todas las emulsiones ensayadas. El tiempo necesario para que RD_p alcance un valor máximo ($RD_{p,máx.}$) es indicativo del balance entre las velocidades de acumulación y disminución del número de gotas. En la mayoría de las emulsiones estudiadas en este trabajo el valor máximo de RD_p se obtuvo a los 60 minutos lo que indica una lenta velocidad de formación de una fase crema estable (Figuras 5.16, 5.17, 5.18).

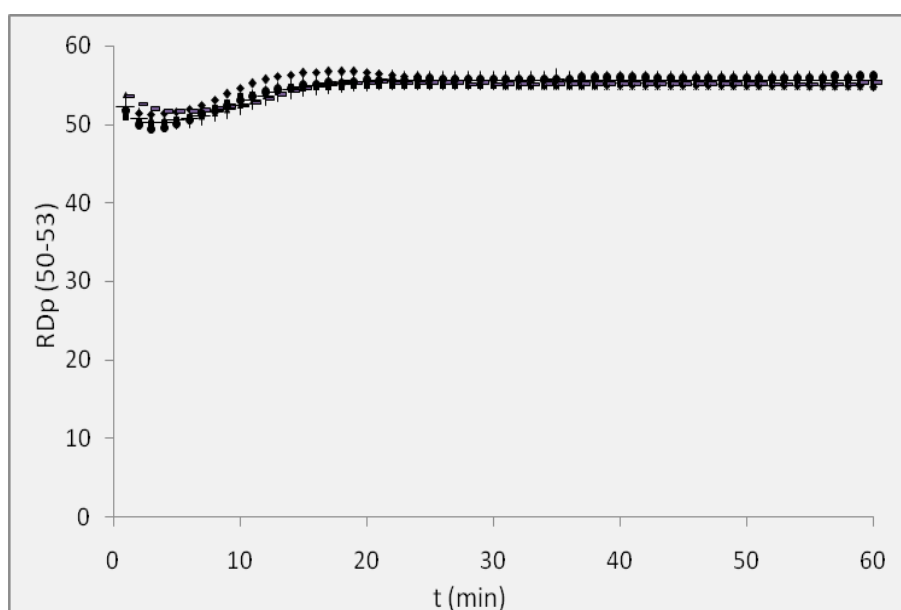


Figura 5.16. Variación de los valores promedio de retrodispersión en la zona 50-53 mm (RD_p 50-53) en función del tiempo de emulsiones preparadas con β -Lg s tt (+); β -Lg c tt 51 h (●); β -Lg c tt 96h (*); 1 10 51 G (◆); 1 10 96 G (■); 1 100 51G (▲); 1 100 96 G (-)

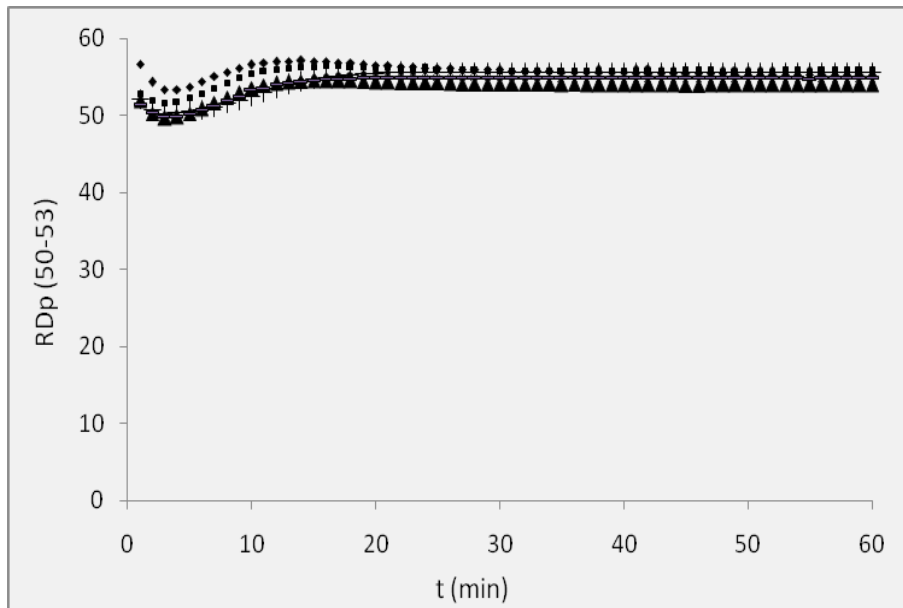


Figura 5.17. Variación de los valores promedio de retrodispersión en la zona 50-53 mm (RDp 50-53) en función del tiempo de emulsiones preparadas con β -Lg s tt (+); β -Lg c tt 51 h (\bullet); β -Lg c tt 96h (*); 1 10 51 L (\blacklozenge); 1 10 96 L (\blacksquare); 1 100 51L (\blacktriangle); 1 100 96 L (-)

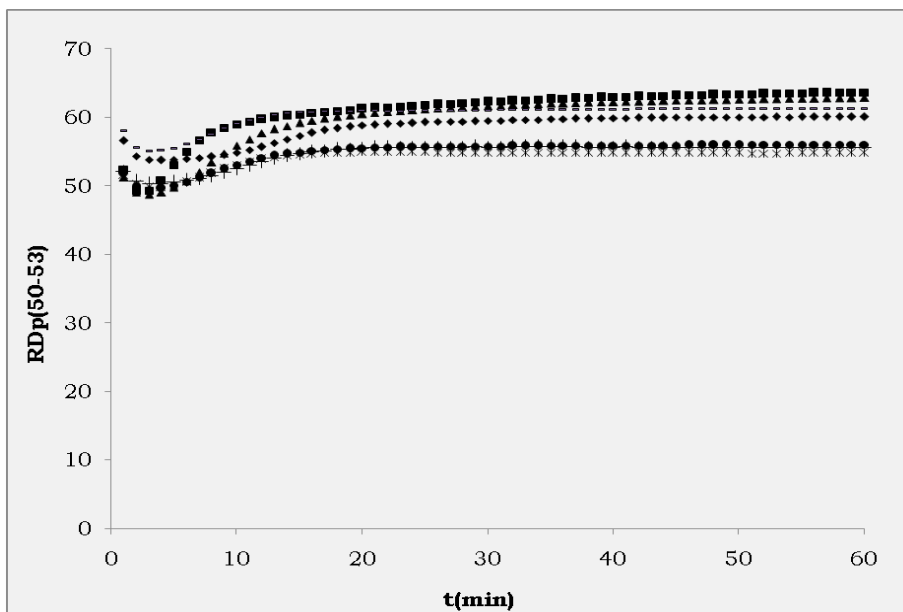


Figura 5.18. Variación de los valores promedio de retrodispersión en la zona 50-53 mm (RDp 50-53) en función del tiempo de emulsiones preparadas con β -Lg s tt (+); β -Lg c tt 51 h (\bullet); β -Lg c tt 96h (*); 1 10 51D (\blacklozenge); 1 10 96 D (\blacksquare); 1 100 51D (\blacktriangle); 1 100 96 D (-)

Tabla 5.11 Grado de desestabilización global (%D) de las emulsiones en estudio

Muestra	%D
Lg s tt	0,1 ± 0,1 a
Lg c tt 51h	0 ± 0,2 a
Lg c tt 96h	0,3 ± 0,2 a
10 51 G	3,0 ± 1,5 b
10 96 G	1,5 ± 2,0 a,b
100 51 G	1,5 ± 1,5 a,b
100 96 G	2,0 ± 1,2 b
10 51 L	3,1 ± 1,3 b
10 96 L	1,6 ± 0,8 a,b
100 51 L	0,8 ± 0,8 a
100 96L	0,9 ± 0,9 a
10 51 D	0,5 ± 0,2 a
10 96 D	0,5 ± 0,2 a
100 51 D	0,3 ± 0,2 a
100 96 D	0,3 ± 0,3 a

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0.05$)

Los valores de D(%) fueron obtenidos a partir de los perfiles de RD. Este parámetro permitió cuantificar la desestabilización global de la fase crema desde su formación hasta el final de su almacenamiento (24 horas). Puesto que es un índice de la disminución de RD_p , asociado a un número más bajo de partículas, puede ser relacionado con la coalescencia y/o floculación. En la Tabla 5.11 se muestran los valores de D% calculada según la (Ecuación 2.34) para todas las condiciones ensayadas. Las emulsiones elaboradas, en las diversas condiciones estudiadas, fueron estables a los procesos de floculación y coalescencia, como se evidencia por los valores de D%, que en ningún caso superaron el 5%. Las emulsiones elaboradas con β -Lactoglobulina glicosilada con glucosa y lactosa con menor relación molar presentaron los mayores porcentajes de desestabilización comparadas con el resto de muestras.

Durante el proceso de migración de gotas hacia la parte superior del tubo, las mismas colisionan entre sí y en este lapso de tiempo la estabilidad de la emulsión frente a la coalescencia está principalmente gobernada por la repulsión estérica entre las capas del surfactante adsorbido y las propiedades viscoelásticas de la película de surfactante. Existen también otros factores importantes que influyen directamente sobre la estabilidad a la coalescencia tales como el comportamiento reológico del film interfacial y la reología global

de la fase crema, la cual está afectada fundamentalmente por la existencia de flóculos y su grado de hidratación. (McClements, 1999).

En el caso de las emulsiones elaboradas con β -Lactoglobulina glicosilada con dextrano la repulsión estérica es más importante que en las otras muestras glicosiladas y retarda la floculación, etapa inicial que conduce a la coalescencia (Damodaran, 2005). El desplegamiento encontrado en la β -Lactoglobulina glicosilada, provocado por la reacción de glicosilación produce interacciones por puente disulfuro y enlaces covalentes entre las moléculas proteicas de la interfase generando una película más viscoelástica y resistente a los procesos de desestabilización.

La velocidad de coalescencia aumenta, a medida que aumenta el tamaño de las gotas de una emulsión ó cuando las gotas se aplastan unas contra otras. Este proceso ocurre en emulsiones muy concentradas como en las capas cremadas (Dickinson y Stainsby, 1982; Walstra, 1996a).

El grado de hidratación de la fase crema se estimó a partir del volumen relativo de fase crema (V_c) calculado de los perfiles de BS % correspondiente a las 24 horas de almacenamiento. Todas las emulsiones preparadas con β -Lactoglobulinas glicosiladas con los diferentes carbohidratos, como las preparadas con β -Lactoglobulina sin glicosilar presentaron un alto grado de hidratación y no mostraron diferencias significativas en el % de hidratación.

5.3.2.3. Análisis de Imagen

El límite de resolución teórico de un microscopio óptico es de aproximadamente $0,2 \mu\text{m}$, pero en la práctica es difícil observar imágenes claras de partículas de tamaño menor a $1-2 \mu\text{m}$ debido al diseño del instrumento y al movimiento browniano de las gotas. Por lo tanto, las gotas pertenecientes a la población I ($0,04-10 \mu\text{m}$) que poseen el menor tamaño y son las mayoritarias en número, no se observan de forma completa. Por lo tanto, las micrografías nos brindan una información parcial de la microestructura de las emulsiones. Lo que se puede observar claramente es si las gotas visibles están o no floculadas y las características de los flóculos formados.

Las micrografías de las emulsiones preparadas con las muestras glicosiladas, Figura 5.19, mostraron una tendencia a la formación de flóculos. Estos flóculos parecen responder a una forma reticular o abierta, se encontrándose interconectados unos a otros en forma de collares.

La presencia o no de flóculos se atribuye a un balance entre las interacciones coloidales atractivas y repulsivas entre las gotas (Mc Clements, 1999; Damodaran, 2005). Si hay un predominio de las interacciones atractivas, las gotas se agregan formando flóculos. Dado que los valores de los diámetros promedio ($D_{3,2}$, $D_{4,3}$) variaron significativamente cuando las determinaciones se realizaron en presencia y en ausencia de SDS, los flóculos que se observan por microscopía se correlacionan con los resultados obtenidos por el analizador de tamaño de partícula en las condiciones de medición (dilución y agitación).

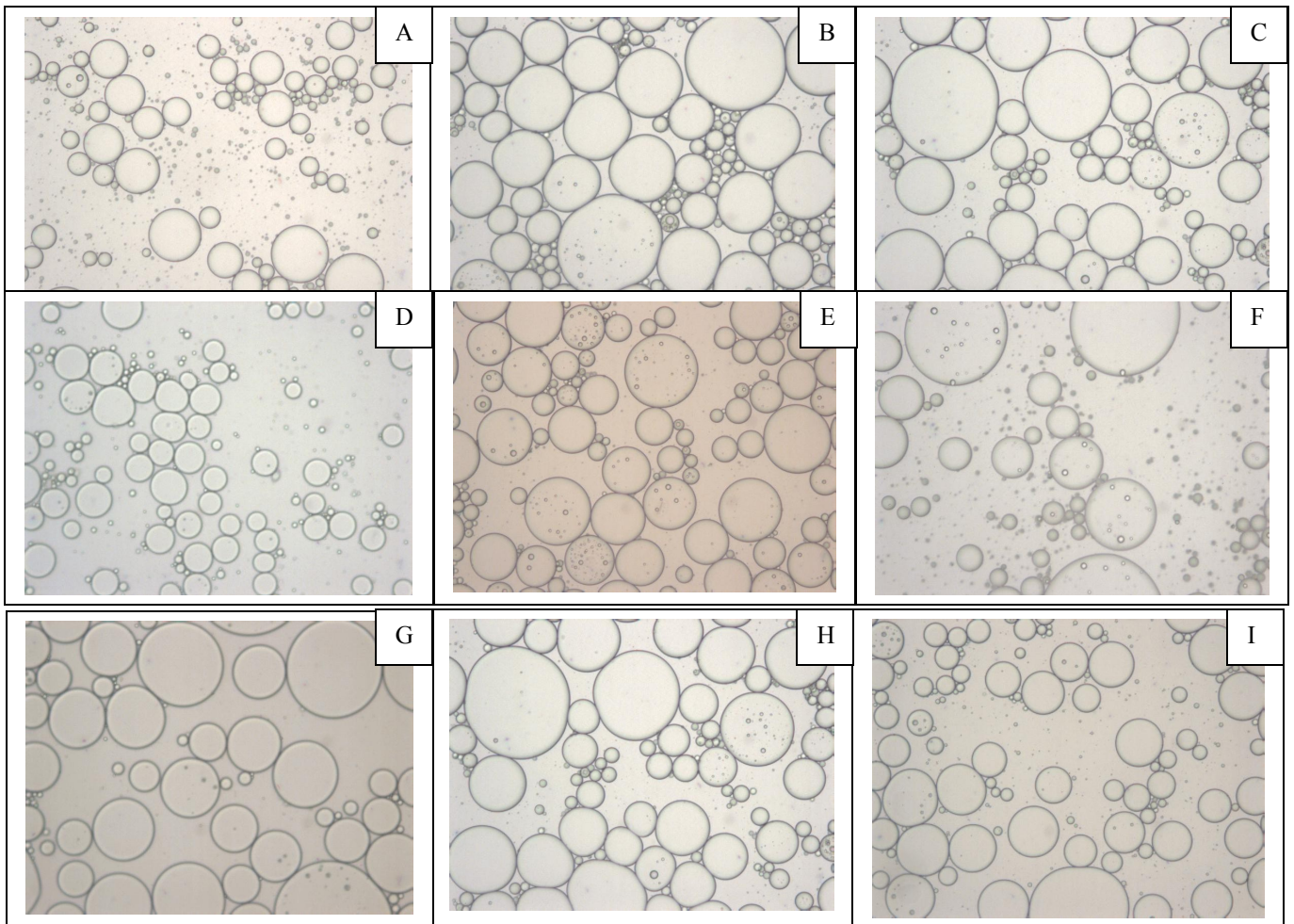


Figura 5.19. Microfotografías de emulsiones preparadas a pH 7,5 con [proteína] = 1 mg/ml de β -Lg s tt (A), β -Lg:Glucosa 1:10 51 (B), β -Lg:Lactosa 1:10 51 (C), β -Lg:Glucosa 1:10 96 (D), β -Lg:Lactosa 1:10 96 (E), β -Lg:Glucosa 1:100 51(F), β -Lg:Lactosa 1:100 51 (G), β -Lg:Glucosa 1:100 96 (H), β -Lg:Lactosa 1:100 96 (I)

Resumen y Conclusiones Parciales

- ✓ La velocidad de adsorción (k_a) y de reordenamiento (k_r) en la interfase de las muestras de β -lactoglobulina glicosiladas con los distintos carbohidratos no presentaron diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) entre ellas ni con las muestras sin modificar. Lo que indicaría que el proceso de adsorción global y el reordenamiento en la interfase no fue afectado por la glicosilación ni con el tratamiento térmico.
- ✓ Las muestras de β -Lactoglobulina sin glicosilar tratadas térmicamente durante 51 y 96 horas exhibieron el menor valor de tensión de equilibrio (γ_e) lo que se corresponde con su mayor hidrofobicidad superficial (H_0).
- ✓ Todas las muestras presentan un comportamiento puramente elástico. En el caso de las muestras glicosiladas se observó una disminución significativa ($\alpha \leq 0,05$) de P_{ed} cuando aumenta el tamaño del azúcar lo que estaría relacionado con un mayor interacción de la molécula en la interfase (mayor flexibilidad).
- ✓ Existen diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) en el tamaño de las gotas de las emulsiones correspondientes a las muestras glicosiladas con los distintos azúcares y las muestras sin modificar. Las primeras presentan una disminución significativa en el valor $D_{3,2}$ correspondiente a las partículas de tamaño menor a $10\mu\text{m}$ en tanto que las partículas de tamaño mayor de $10\mu\text{m}$ presentan un aumento significativo de $D_{3,2}$ cuando la proteína es glicosilada. Al analizar el efecto global del tamaño se encontró que el $D_{3,2}$ aumenta significativamente ($\alpha \leq 0,05$) con la glicosilación.
- ✓ De todas las emulsiones estudiadas las glicosiladas con dextrano fueron las que presentaron el menor grado de floculación, no más de 10%, en particular las muestras preparadas con la relación molar 1:100 fueron las más estables. La mayor estabilidad en las muestras de relación molar mayor también se observa en el caso de muestras de β -Lactoglobulina modificadas con lactosa. En el caso

de la modificación con glucosa el mayor grado de floculación se presenta en las muestras glicosiladas durante 51 horas.

- ✓ Las muestras glicosiladas son más estables al cremado que las muestras sin glicosilar (β -Lg s tt, β -Lg c tt 51h y β -Lg c tt 96 h). Las constantes cinéticas k_h y k_s no mostraron diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) entre las muestras sin glicosilar. En el caso de la constante k_h , cuando aumenta el grado de glicosilación con el tiempo de reacción de 51 a 96 horas para glucosa y lactosa, su valor disminuye. Lo mismo sucede cuando aumenta la relación molar de 1:10 a 1:100. En el caso de la modificación de β -Lactoglobulina con dextrano el efecto de retardo del cremado solo se observan cuando aumenta la relación molar de 1:10 a 1:100.
- ✓ Las posibles causas de la mayor estabilidad de las muestras glicosiladas son la modificación del PI de la β -lactoglobulina por el diferente grado de glicosilación, la disminución en el tamaño de partícula y el aumento significativo ($\alpha \leq 0,05$) en la concentración de proteína interfacial (Γ) en el caso de las emulsiones preparadas con muestras glicosiladas con dextrano y lactosa.
- ✓ La velocidad de cremado también puede ser retrasada por la formación de flóculos con estructura de red abierta: Aunque en la determinación de tamaño de partícula de las emulsiones glicosiladas con dextrano y lactosa recién preparadas el grado de floculación fue bajo, las microfotografías ópticas mostraron flóculos que parecen responder a una forma reticular o abierta, interconectados unos a otros en forma de collares.
 - ✓ Las emulsiones, elaboradas en las diversas condiciones de ensayo, fueron estables a los procesos de floculación y coalescencia en la fase crema formada, hecho evidenciado por el bajo %D (RD_{p50-53}) encontrado a las 24 horas de almacenamiento estanco. Este hecho correlaciona directamente con el alto porcentaje de hidratación presentado por las muestras, el contenido de agua intersticial es suficiente para evitar la floculación y coalescencia.

6.- CONCLUSIONES FINALES

6.- CONCLUSIONES FINALES

Los cambios estructurales inducidos en la β -Lactoglobulina por la reacción de glicosilación se incrementan significativamente al aumentar el tamaño molecular del carbohidrato empleado en la reacción. En tanto que el grado de glicosilación disminuyó significativamente con el aumento del tamaño molecular del carbohidrato utilizado en la modificación de la proteína.

La β -Lactoglobulina glicosilada con glucosa presentó el mayor grado de glicosilación con un número medio de monómeros unidos a la proteína que alcanzó a 19 en las condiciones de mayor relación molar y mayor tiempo de reacción ensayados. Además presentó el mayor grado de avance de la reacción de Maillard, evidenciado por el menor contenido de furosina

Las β -Lactoglobulinas glicosiladas con lactosa y dextrano no presentaron diferencias significativas en el grado de glicosilación alcanzado al variarse el tiempo de reacción y la relación molar.

Las propiedades espumantes de la β -Lactoglobulina mejoraron significativamente ($\alpha \leq 0,05$) luego de la glicosilación. El incremento del tamaño del carbohidrato sustituyente provocó un aumento significativo de los valores de V_i y V_{LEmax} y de la estabilidad de las espumas formadas.

Las emulsiones preparadas con β -Lactoglobulina glicosilada presentaron una mayor estabilidad global que las emulsiones formuladas con β -Lactoglobulina.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

-
- Akita, E. y Nakai, S. (1990).** Lipophilization of β -lactoglobulin: effect on hydrophobicity, conformation and surface functional properties. *Journal of Food Science*, 55, 711–717.
- Alais, M.; Hidalgo, F. y Zamora, R. (1997).** Comparative antioxidant activity of Maillard and oxidized lipid damaged bovine serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45, 3250-3254
- Amiot, J. (1994).** Ciencia y [Tecnología](#) de la Leche. Universite Laval Quebec. Acribia, Zaragoza, [España](#).
- Antón, M.; Beaumal, V.; Brossard, C.; Llamas, G. y Le Denmat, M. (2002).** Droplet flocculation and physical stability of oil-in-water emulsions prepared with hen egg yolk. En *Food emulsions and dispersions*. Editado por Anton, M. Research Signpost, Kerala, India. 15–28.
- AOAC (1995).** AOAC Official Method 991.20 Nitrogen (Total) in Milk Kjeldhal Methods. Maryland, USA, AOAC International.
- Aoki, T.; Kitihata, K.; Fukumoto, T.; Sugimoto, Y.; Ibrahim, H.; Kimura, T.; Kato, Y. y Matsuda, T. (1997).** Improvement of functional properties of β -lactoglobulin by conjugation with glucose-6-phosphate through the Maillard reaction. *Food Research International* 30, 401-406.
- Aouzelleg, A. y Bull, L. (2004).** Differential scanning calorimetry study of pressure/temperature processed β -lactoglobulin: The effect of dextran sulphate. *Food Research International* 37, 933–940
- Apenten, R. (1998)** Protein stability function relations: β -lactoglobulin- A sulphhydryl group reactivity and its relationship to protein unfolding and stability. *International Journal of Biological Macromolecules* 23, 19-25
- Arteaga, G.; Li-Chan, E.; Nakai, S.; Cofrades, S. y Jiménez Colmenero, F. (1993).** Ingredient interaction effects on protein functionality: mixture design approach. *Journal of Food Science*. 58, 656-662.
- Arteaga, G. y Nakai, S. (1993).** Predicting protein functionality with artificial neural networks: Foaming and emulsifying properties. *Journal of Food Science*. 58, 1152-1156.
- Ashoor, S. y Zent, J. (1984).** Maillard browning in common amino acids and sugars. *Journal of Food Science*. 49, 1206–1207
- Aymard, P.; Gimel, J.-C.; Nicolai, T. y Durand, D. (1996).** Experimental evidence for a two-step process in the aggregation of β -lactoglobulin at pH 7. *Journal de Chimie Physique*. 93, 987–997.
- Ben-Gara, I. y Zimmerman, G. (1972).** Changes in the nitrogenous constituents of staple foods and feeds during storage. I. Decrease in the chemical availability of lysine. *Journal of Food Science and Technology*. 9, 113–118.

-
- Benjamins, J.; Cagna, A. y Lucassen-Reynders, E. (1996)** Viscoelastic properties of triacylglycerol/water interfaces covered with proteins. *Colloid and Surfaces*. 114, 245-254.
- Benjamins, J. y Lucassen-Reynders, E. H. (1998)** Proteins at liquid interfaces. Editado por D. Mobius and R. Miller, Elsevier, Amsterdam. 341-384.
- Bouhallab, S.; Morgan, F.; Henry, G.; Mollé, D.; Leonil, J. (1999).** Formation of Stable Covalent dimer explains the high solubility at pH 4.6 of lactose- β -lactoglobulin conjugates heated near neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 1489-1494
- Bremer, L. G. B. (1992).** Theoretical and experimental study of the fractal nature of the structure of particle gels. Tesis, Wageningen Agricultural University, The Netherlands.
- Brew, K. y Grobler, J. (1992)** α -lactalbumin. En: *Advanced Dairy Chemistry*. Editado por Fox P.F.; Volume 1: Proteins, 2^a edición, Elsevier Applied Science, London. UK. 191-229.
- Broersen, K.; Voragen, A.; Hamer, R. y de Jongh, H. (2004).** Glycoforms of β -lactoglobulin with improved thermostability and preserved structural packing. *Biotechnology and Bioengineering*. 86, 78-87.
- Browdy, A. y Harris, N. (1997).** Whey improves oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Science*. 62, 348-350
- Bruggemann, J. y Erbersdobler, H. (1968).** Fructoselysin als wichtigstes Reaktionsprodukt von Lysin mit Glucose bei Hitzeschädigung von Lebens- und Futtermitteln (Fructoselysine as the main heat-induced product of the reaction between lysine and glucose in food and feed). *Zeitschrift Für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*. 137, 137-143
- Burton, H. (1968).** "Deposits of Whole Milk in Treatment Plants- A Review." *Journal of Dairy Research* 35, 317-330.
- Burvall, A.; Asp, N.; Bosson, A.; San Jose, C. y Dahlgist, A. (1978).** Storage of lactose-hydrolysed dried milk: effect of water activity on the protein nutritional value. *Journal of Dairy Research*. 45, 381-389
- Busti, P.; Gatti, C. y Delorenzi, N. (2006)** Binding of alkylsulfonate ligands to bovine β -lactoglobulin: Effects on protein thermal unfolding. *Food Research International* 39, 503-509
- Calvo, M. (2008)** Curso Bioquímica de los alimentos. Universidad de Zaragoza. <http://milksci.unizar.es/bioquimica/uso.html>
- Carp, D. (2001).** Formación y estabilidad de espumas de proteínas de soja: efecto de la desnaturalización térmica y de la interacción con polisacáridos. Tesis, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

-
- Carp, D.; Bartholomai, G. y Pilosof, A. (1997).** A kinetic model to describe liquid drainage from soy protein foams over an extensive protein concentration range. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 30, 253-258
- Carrera Sánchez, C. y Rodríguez Patino, J. (2005).** Interfacial, foaming and emulsifying characteristics of sodium caseinate as influenced by protein concentration in solution. *Food Hydrocolloids*. 19, 407-416.
- Cefalu, W.; Bell-Farrow, A.; Wang, Z. y Ralapati, S. (1991).** Determination of furosine in biomedical samples employing and improved hydrolysis and HPLC technique. *Carbohydrate Research* 215, 117-125.
- Cheftel, J.; Cuq, J. y Lorient, D. (1989).** Proteínas alimentarias; bioquímica, propiedades funcionales, valor nutritivo, modificaciones químicas. Acribia, Zaragoza, España.
- Cheftel, J.; Cuq, J. y Lorient, D. (1993).** Aminoácidos, péptidos y proteínas. En: *Química de los Alimentos*. Editado por Fennema, O. W. Acribia, Zaragoza, España. 275 -414.
- Chevalier, F.; Chobert, J.; Dalgalarrodo, M. y Haertle, T. (2001a).** Characterization of the Maillard reactions products of β -lactoglobulin glucosylated in mild conditions. *Journal of Food Biochemistry*. 25, 33-55.
- Chevalier, F.; Chobert, J.; Genot, C. y Haertle, T. (2001b).** Scavenging of free radicals, antimicrobial and cytotoxic activities of the Maillard reaction products of β -lactoglobulin glyated with several sugars; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 5031-5038
- Chevalier, F.; Chobert, J.; Popineau, Y.; Nicolas, M. G. y Haertle, T. (2001c).** Improvement of functional properties of β -lactoglobulin glyated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar. *International Dairy Journal*. 11, 145-152.
- Chevalier, F.; Chobert, J.; Dalgalarrodo, M.; Choiset, Y. y Haertle, T. (2002).** Maillard glycation of β -lactoglobulin induces conformation changes. *Nahrung*. 46, 58-63.
- Chobert, J.; Bertrand-Harb, C. y Nicolas, M. (1988).** Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 36, 883-892
- Chobert, J.; Sitohy, M. y Whitaker, J. (1987).** Specific limited hydrolysis and phosphorylation of food proteins for improvement of functional and nutritional properties. *Journal of the American Oil of Chemists Society*. 64, 1704-1711.
- Cicuta, P. y Hopkinson, I. (2001).** Studies of a weak polyampholyte at the air-buffer interface: The effect of varying pH and ionic strength. *Journal of Chemical Physics*. 114, 8659-8670.

-
- Closs, B.; Courthaudon, J. y Lorient, D. (1990).** Effect of Chemical Glycosylation on the surface properties of the soluble fraction of casein. *Journal of Food Science*. 55, 437-439,461.
- Courthaudon, J.; Colas, B. y Lorient, D. (1989).** Covalent Binding of Glycosyl residues to Bovine Casein: Effects on Solubility and Viscosity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 37, 32-36.
- Dagorn-Scaviner, C.; Guéguen, J. y Lefebvre, J. (1987).** Emulsifying properties of pea globulins as related to their adsorption behaviors. *Journal of Food Science*. 52, 335-341.
- Damodaran, S. (2005).** Protein stabilization of emulsions and foams. *Journal of Food Science*. 70, 54 – 66.
- Damodaran, S. (1997).** Protein-stabilized foams and emulsions. En: *Food proteins and their applications*. Editado por Damodaran, S. y Paraf, A. Marcel Dekker, New York, USA. 57–110.
- Damodaran, S. (1996).** Amino acids, peptides, and proteins, En: *Food chemistry*. Editado por Fennema, O. R. Marcel Dekker, New York, USA. 321–429.
- Damodaran, S. (1990).** Interfaces, protein films, and foams. En *Adv. Food Nutr. Res.* Editado por Kinsella, J. E. Academic Press, Inc. San Diego. 34, 1-79.
- Damodaran, S. (1989).** Interrelationship of molecular and functional properties of food proteins. En: *Food proteins*. Editado por Kinsella, J. E. y Souci, W. G. AOCS, Champaign. 21-51.
- Damodaran, S. y Anand, K. (1997).** Sulfhydryl-disulfide interchange-induced interparticle protein polymerization in whey protein-stabilized emulsions and its relation to emulsion stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45, 3813–3820.
- Damodaran, S. y Kinsella, J. (1982).** Food protein deterioration mechanisms and functionality. American Chemical Society, New York.
- Damodaran, S. y Song, K. (1988).** Kinetics of adsorption of protein at interfaces: role of protein conformation in diffusional adsorption. *Biochimica et Biophysica Acta*. 954, 253-264
- Damodaran, S. y Xu, S. (1996).** [The Role of Electrostatic Forces in Anomalous Adsorption Behavior of Phosvitin at the Air/Water Interface](#). *Journal of Colloid and Interface Science*. 178, 426-435
- Das, A. y Ghosh, P. (1990).** Concentrated emulsions: investigation of polydispersity and droplet distortion and their effect on volume fraction and interfacial area. *Langmuir*. 6, 1668-1675

-
- Delgado, T.; Corzo, N.; Santa-Maria, G.; Jimeno, M. L. y Olano, A. (1992).** Determination of furosine in milk samples by ion-pair reversed phase liquid chromatography. *Chromatographia*. 33, 374-76
- Desrosiers, T.; Savoie, L.; Bergeron, G. y Parent, G. (1989).** Estimation of lysine damage in heated whey proteins by furosine determination in conjunction with the digestion cell technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 37, 1385-1391.
- De Wit, J. y Swinkels, G. (1980).** A differential scanning calorimetric study of the thermal denaturation of bovine β -lactoglobulin thermal behaviour at temperatures up to 100 °C. *Biochimica et Biophysica Acta*. 624, 40-50.
- De Wit, J. y Klarenbeek, G. (1984).** Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science*. 67, 2701-2710.
- Dickinson, E. (1992a).** An introduction to food colloids. Oxford Science Publications, Oxford, UK.
- Dickinson, E. (1992b).** Structure and composition of adsorbed protein layers and the relationship to emulsion stability. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*. 88, 2973-2983.
- Dickinson, E. y 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, 26-30.
- Dickinson, E. y Matsumura, Y. (1994).** Proteins at liquid interfaces: Role of the molten globule state. *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*. 3, 1-17.
- Dickinson, E.; Flint, F. O. y Hunt, J. A. (1989).** Bridging flocculation in binary protein stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*. 2, 389-397
- Dickinson, E.; Golding, M. y Povey, M. (1997).** Creaming and flocculation of oil-in-water emulsions containing sodium caseinate. *Journal of Colloid and Interface Science*. 185, 515-529
- Dickinson, E. y Stainsby, G. (1982).** *Colloids in Food*. Applied Science Publishers, London, UK.
- Dong, A.; Matsuura, J.; Allison, S. D.; Chrisman, E.; Manning, M. C. y Carpenter, J. (1996).** Infrared and circular dichroism spectroscopic characterization of structural differences between β -lactoglobulin A and B. *Biochemistry*. 35, 1450-1457.
- Dunlap, C. y Cootea, G. (2005).** β -Lactoglobulin-Dextran Conjugates: Effect of Polysaccharide Size on Emulsion Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 419-423

-
- Durand, M.; Martinoty G. y Langevin D. (1999).** Liquid flow through aqueous foams: From the plateau border-dominated regime to the node-dominated regime. *Physical Review E*, 60, R6307-R6308,
- Elizalde, B. , Giaccaglia, D.; Pílosof, A. y Bartholomai, G. (1991).** Kinetics of liquid drainage from protein-stabilized foams. *Journal of Food Science*. 56, 24-26, 30
- Erbersdobler, H. (1986).** Twenty years of furosine-better knowledge about the biological significance of the Maillard in food and nutrition. En: *Amino-carbonyl reaction in food and biological systems*. Editado por M. Fujimaki, M. Namiki y H. Kato. Elsevier, Amsterdam. 481-491.
- Erbersdobler, H. y Zucker, H. (1966).** Studies on the content of lysine and available lysine in skim milk powder. *Milchwissenschaft*. 21, 564-568
- Evangelisti, F.; Calcagno, C. y Zunin P. (1994).** Relationship between blocked lysine and carbohydrate composition of infant formulas. *Journal of Food Science*. 59, 335-337.
- Fenaille, F.; Morgan, F.; Parisod, V.; Tabet, J.-C. y Guy, P. A. (2003).** Solid-state glycation of β -lactoglobulin monitored by electrospray ionisation mass spectrometry and gel electrophoresis techniques. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 17, 1483-1492.
- Finot, P.; Bricout, J.; Viani, R.; Mauron, J. (1968).** Identification of a new lysine derivative obtained upon acid hydrolysis of heated Milk. *Experientia*. 24, 1097-1099
- Flower, D. R. (1996)** The lipocalin protein family: Structure and function. *The Biochemical Journal*. 318, 1-14
- Flower, D. R.; North, A. y Sansom C. (2000).** The lipocalin protein family: structure and sequence overview. *Biochimica* 1482, 9-24.
- Fogliano, V.; Monti, S.; Visconti, A.; Randazzo, G. y Facchiano, A. (1998).** Identification of a β -lactoglobulin lactosylation site. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1388, 295-304.
- Ford, C.; Connett, M. y Wilkins, R. (1993).** B-Lactoglobulin expression in bovine mammary tissue. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. 53, 167-169.
- Ford, L.; Borwankar, R.; Martin R. y Holcomb, D. (1997).** Dressing and sauces páginas. En *Food Emulsions: Third edition, revised and expanded*. Editado por Friberg, S.E y Larsson, K. Marcel Dekker, Inc., New York, USA. 361-412.
- Fox, P. (1988).** *Developments in Dairy Chemistry. Functional Milk Protein*. Applied Science Publishers, London.

-
- Fox, P. y Flynn, A. (1992)** Biological properties of milk proteins. En *Advanced Dairy Chemistry Vol. I. Proteins*. Editado por B. L. Larson. Elsevier Applied Science, London and New York.
- Fox, P. y Kelly, A. (2004)**. The caseins en *Proteins*. En *Food processing*. Editado por R. Y. Yada. CRC Press y Woodhead Publishing limited. Cambridge, Reino Unido.
- Freer, E.; Yin, K.; Fuller, G. y Radke, C. (2004)**. Interfacial Rheology of Globular and Flexible Proteins at the Hexadecane/Water Interface: Comparison of Shear and Dilatation Deformation Surface Dilational Modulus or Gibbs' Elasticity of Protein Adsorption Layers. *The Journal of Physical Chemistry B*. 108, 3835-3844
- French, S.; Harper, J.; Kleinholz, N.; Jones, R. y Greenchurch, K. (2002)**. Maillard reaction induced lactose attachment to bovine β -lactoglobulin: electrospray ionization and matrix-assisted laser desorption/ionization examination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 820-823.
- Friberg, S. (1997)**. Emulsion stability. En: *Food Emulsions*, Third edition, revised and expanded. Editado por S. E. Friberg y K. Larsson. Marcel Dekker, Inc., New York, USA. 1-55.
- Funtenberger, S.; Dumay, E. y Cheftel, J. (1997)**. High-pressure promotes β -lactoglobulin aggregation through SH/S-S interchange reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45, 912-921.
- Gotham, S.; Fryer, P. y Pritchard, A. (1992)**. β -Lactoglobulin denaturation and aggregation reactions and fouling deposit formation: a DSC study. *International Journal of Food Science and Technology*. 27, 313-327.
- Graham, D. y Phillips, M. (1979)**. Proteins at liquid interfaces. III Molecular structures of adsorbed films. *Journal of colloid interface Science*. 70, 427-433.
- Green, D.; Aschaffenburg, R.; Camerman, A.; Coppola, J.; Dunnill, P.; Simmons, R. M.; Komorowski, E.; Sawyer, L.; Turner, E. y Woods, K. (1979)**. Structure of β -lactoglobulin at 6 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 31, 375-397.
- Gutiérrez, G.; Ganfornina, M. D. y Sanchez, D. (2000)**. Evolution of the lipocalin family as inferred from a protein sequence phylogeny. *Biochimica et biophysica Acta*. 1482, 35-45.
- Halling, P. J. (1981)**. Protein stabilized foam and emulsions. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 15, 155-203.
- Hambling, S.; Mc. Alpine, A. y Sawyer, L. (1992)** β -Lactoglobulin. En: *Advanced Dairy Chemistry*. Editado por P. F. Fox; Volume 1 *Proteins*, 2ª edición. Elsevier Applied Science. London, UK. 141-190.

-
- Handa, A. y Kuroda, N.; (1999).** Functional Improvements in Dried Egg White through the Maillard Reaction; Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47, 1845-1850
- Hattori, M.; Ametani, A.; Katakura, Y.; Shimizu, M. y Kaminogawa, S. (1993).** Unfolding/refolding studies on bovine β -lactoglobulin with monoclonal antibodies as probes: Does a renatured protein completely refold. Journal of Biological Chemistry. 268, 22414-22419.
- Hattori, M.; Ogino, A.; Nakai, H. y Takahashi, K. (1997).** Functional improvement of β -lactoglobulin by conjugation with alginate lyase-lysate. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45, 703-708
- Hattori, M.; Okada, Y. y Takahashi, K. (2000).** Functional changes in β -lactoglobulin upon conjugation with Carboxymethyl Cyclodextrin. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48, 3789-3794.
- Hayakawa, S. y Nakai, S. (1985).** Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. Journal of Food Science. 50, 486-491.
- Heyns, K.; Heukeshoven, J. y Brose, K. (1968).** Degradation of fructose amino acids to N-(2-furoylmethyl)amino acids. Intermediates in browning reactions. Angewandte Chemie-International Edition. 7, 628-629.
- Hiroaka, Y, Segawa, T.; Kuwajima, K. Sugai, S. y Murai, N. (1980)** α -lactalbumin: a calcium metallo-protein. Biochemical and Biophysical Research Communications, 93:1098-1104.
- Hodge, J. (1953).** Chemistry of browning reactions in model systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1, 928-943.
- Hoffmeister, D. (1989).** Mammals of Illinois. University of Illinois Press, Urbana and Chicago, Illinois, USA.
- Hurley, W. (2000).** Lactation biology. Illinois University Press. Urbana - Champaign. USA
- Iametti, S.; De Gregori, B.; Vecchio, G. y Bonomi, F. (1996).** Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of β -lactoglobulin. European Journal of Biochemistry. 247, 106-112.
- Israelachvili, J. (1992).** Intermolecular and surface forces. Academic Press, New York. 176-178.
- Jameson, G.; Adams, J. y Creamer, L. (2002).** Flexibility, functionality and hydrophobicity of bovine β -lactoglobulin. International Dairy Journal. 12, 319-329.
- Jiménez-Castaño, L.; López-Fandiño, R.; Olano, A. y Villamiel, M. (2005).** Study on β -Lactoglobulina glycosylation with dextran: effect on solubility and heat stability. Food Chemistry. 93, 689-695
-

-
- Jiménez-Colmenero, F. y García-Matamoros, E. (1981).** Effects of washing on the properties of mechanically deboned meat. En: Proceedings of the 27th European Meeting of Meat Research Workers. Editado por O. Pränd. Viena. 351-354.
- Jones A.; Tier L. y Wilkins J. (1998).** Analysis of the Maillard reactions products of β -lactoglobulin and lactose in skimmed milk powder by capillary electrophoresis and electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 822, 147-154
- Ju, Z.; Hettiarachchy, N. y Kilara, A. (1999).** Thermal properties of whey protein aggregates. *Journal of Dairy Science.* 82, 1882-1889.
- Kaminogawa, S.; Shimizu, M.; Ametani, A.; Hattori, M.; Ando, O. y Hachimura, S. (1989).** Monoclonal antibodies as probes for monitoring the denaturation process of bovine β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta.* 998, 50-56.
- Kato, A. (2002).** Industrial applications of Maillard-type protein-polysaccharide Conjugates. *Food Science and Technology Research.* 8, 193-199.
- Kato, A. y Nakai, S. (1980).** Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlations with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta,* 624(1), 13-20.
- Kato, A.; Osako, Y.; Matsudomi, N. y Kobayashi, K. (1983).** Changes in the emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation. *Agricultural and Biological Chemistry.* 47, 33-37
- Kato, Y.; Matsuda, T.; Kato, N.; Watanabe, K.; Nakamura, R. (1986).** Browning and insolubilization of ovalbumin by the Maillard reaction with some aldohexoses. *Journal of Agric. Food chem.* 34: 351-355
- Kato, Y.; Auki, T.; Kato, N.; Nakamura, R. y Matsuda, N. (1995).** Modification of ovalbumin with glucose-6-phosphate by amino-carbonyl reaction. Improvement of protein heat stability and emulsifying activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 43, 301.305.
- Kauten, R. J.; Maneval, J. E. y Mc Carthy, M. J. (1991).** Fast determination of spatially localized volume fractions in emulsions. *Journal of Food Science.* 56, 799-801.
- Kinsella, J. (1979).** Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil of Chemists Society.* 56, 242-258.
- Kinsella, J. (1984).** Milk proteins: physicochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 21, 197-262
- Kinsella, J.; Whitehead, D. y Brady, J. (1988).** Development in Dairy Chemistry. 4. Functional Milk Proteins. *Milk Proteins: Possible*

Relationships of Structure and Function. P. F. Fox. Applied Science Publishers, London, UK.

- Kitabatake, N.; Cuq, J. y Cheftel, J. (1985).** Covalent binding of glycosil residues to b-lactoglobulin: effects on solubility and heat stability; Journal of Agricultural and Food Chemistry. 33, 125-130.
- Kitabatake, N. y Doi, E. (1988).** Surface tension and foamability of protein and surfactant solutions. Journal of Food Science. 53, 1542-1545, 1569.
- Kobayashi, K.; Hirano, A.; Ohta, A.; Yoshida, T.; Takahashi, K. y Hattori, M. (2001).** Reduced Immunogenicity of β -lactoglobulin by conjugation with Carboxymethyl Dextran differing in Molecular Weight. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49, 823-831.
- Kobayashi, K.; Yoshida, T.; Takahashi, K. y Hattori, M. (2003).** Modulation of the T-cell response to β -lactoglobulin by conjugation with Carboxymethyl Dextran; Bioconjugate. Chemical 14, 168-176
- Koradi, R.; Billeter, M. y Wüthrich, K. (1996).** MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. Journal of Molecular Graphics. 14, 51-55.
- Kraulis, P. J. (1991).** MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. Journal of Applied Crystallography. 24, 946-950.
- Kushibiki, S.; Hodate, K.; Kurisaki, J.; Shingu, H.; Ueda, Y.; Watanabe, A. y Shinoda, M. (2001).** Effect of β -Lactoglobulina on plasma retinol and triglyceride concentrations, and fatty acid composition in calves. Journal of Dairy Research. 68, 579-586.
- Kuwata, K.; Hoshingo, M.; Forge, V.; Era, S.; Batt, C. y Goto, Y. (1999).** Solution structure and dynamics of bovine β -lactoglobulin A. Protein Science. 8, 2541-2545.
- Kim, S. y Kinsella, J. (1985).** Surface activity of food proteins: relationships between surface pressure development, viscoelasticity of interfacial films and foam stability of govine serum albumin. Journal of Food Science. 50, 1526-1530.
- Langevin, D. (2000).** Influence of interfacial rheology on foam and emulsion properties. Advances in Colloid and Interface Science. 88, 209-222.
- Leonil, J.; Molle, D.; Fauquant, J.; Maubois, J.; Pearce, R. y Bouhallab, S. (1997).** Characterization by ionization mass spectrometry of lactosyl b-lactoglobulin conjugates formed during heat treatment of milk and whey and identification of one lactose-binding site. Journal of Dairy Science. 80, 2270-2281
- Loisel, W.; Guéguen, J. y Popineau, Y. (1993).** A new apparatus for analyzing foaming properties of proteins. En: Food proteins:

Structure and functionality. Editado por K. D. Schwenke y R. Mothes. Weinheim, Germany: VCH. 320-323.

- López, F. y Olano, A. (1999).** Selected indicators of the quality of thermal processed milk. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos Internacional*. 5, 121-137.
- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A. y Randall, R. (1951).** Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265-275.
- Lucassen-Reynders, E. (1993).** Interfacial viscoelasticity in emulsions and foams. *Food Structure*. 12, 1-12.
- Lucassen-Reynders, E. y Kuipers, K. (1992).** The role of interfacial properties in emulsification. *Colloids Surfaces*. 65, 175-184.
- Maillard, L. C. (1912).** Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoïdines par voie méthodique. *Compte Rendu Academie des Sciences*. 154: 66-68
- Mackie, A. R.; Gunning, A. P.; Pugnali, L. A.; Dickinson, E.; Wilde, P. J. y Morris, V. J. (2003).** Growth of surfactant domains in protein films. *Langmuir*. 19, 6032-6038.
- Manderson, G.; Creamer, L. y Hardman, M. (1999).** Effect of heat treatment on the circular dichroism spectra of bovine β -lactoglobulin A, B, and C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 4557-4567.
- Marcia, K.; Walker, D.; Farkas, F.; Anderson, S. y Meunier-Goddik, L. (2004).** Effects of High-Pressure Processing at Low Temperature on the Molecular Structure and Surface Properties of β -Lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 8230-8235
- Markwell, M. A.; Haas, S. M.; Bieber, L. L. y Tolbert, N. E. (1978).** A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*. 87, 206-210.
- Maubois, J.; Leonil, S.; Boulhallb, S. y Molle, D. (1995).** Characterization by ionizing mass spectrometry of a lactosyl-b-lactoglobulin conjugate occurring during milk heating of whey. *Journal of Dairy Science*. 78, 133.
- Magdassi, S. y Kamyshny, A. (1996).** Surface Activity of Proteins: Chemical and Physicochemical Modifications. En: *Surface and Functional Properties of Proteins*. Editado por S. Magdassi. Marcel Dekker Inc.; New York, USA. 1-38.
- Matsuda, T.; Kato, Y. y Nakamura, R. (1991).** Lysine loss and polymerization of bovine β -lactoglobulin by amino-carbonyl reaction with lactulose (4-O-beta-galactopyranosyl- D-fructose). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 39, 1201-1204.

-
- Matsudomi, N.; Inoue, Y.; Nakashima, H.; Kato, A. y Koboyashi, K. (1995).** Emulsion stabilization by Maillard-type covalent complex of plasma protein with galactomannan. *Journal of Food Science*. 60, 265-268, 283.
- Matsudomi, N.; Nakano, K.; Soma, A. y Ochi, A. (2002).** Improvement of gel properties of dried egg white by modification with Galactomannan through the Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 4113-4118
- McClements, D. (1999).** Food emulsions. Principles, practice and techniques. CRC Press. USA.
- Mellema, M.; Clark, D.; Husband, F. y Mackie, A. (1998)** Properties of α -Casein at the Air/Water Interface As Supported by Surface Rheological Measurements. *Langmuir*, 1998, 14, 1753-1758.
- Miller, R.; Hofmann, A.; Hartmann, R.; Halbig, A. y Schano, K. (1992).** Measuring dynamic surface and interfacial tensions. *Advanced Materials*. 4, 370-374.
- Mitidieri, F.; Puppo, M. y Wagner, J. (2001).** Comportamiento reológico y coalescencia de fase crema de emulsiones estabilizadas por aislados de soja en Ingeniería de Alimentos. 275-280. En: *Nuevas Fronteras en el siglo XXI. Tomo I: Propiedades físicas y aspectos fisicoquímicos en relación con los procesos alimentarios*. Editado por P. Fito, A. Mulet, A. Chiralt y A. Andrés. Editorial UPV, Valencia, España.
- Mitidieri, F. y Wagner, J. R. (2002).** Coalescence of o/w emulsions stabilized by whey and isolate soybean proteins. Influence of thermal denaturation, salt addition and competitive interfacial adsorption. *Food Research International*. 35, 547-557
- Monsalve, A. y Schechter, R. (1984).** The stability of foams: Dependence of observation on the bubble size distribution. *Journal of Colloid and Interface Science*. 97, 327-335.
- Morgan, F.; Leonil, J.; Molle, D. y Bouhallab, S. (1997).** Nonenzymatic lactosylation of bovine β -lactoglobulin under mild heat treatment lead to structural heterogeneity of the glycoforms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 236, 413-417.
- Morgan, F.; Leonil, J.; Molle, D. y Bouhallab, S. (1999a).** Modification of bovine β -lactoglobulin by glycation in a powdered state or in an aqueous solution: Effect on association behavior and protein conformation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 83-91.
- Morgan, F.; Venien, A.; Bouhallab, S.; Molle, D. y Leonil, J. (1999b).** Modification of bovine β -lactoglobulin by glycation in a powdered state or in an aqueous solution: Immunochemical Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 4543-4548.
-

-
- Moreno, F.; López-Fandiño, R. y Olano, A. (2002).** Characterization and functional properties of lactosyl caseinmacropeptide conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 5179–5184.
- Nagasawa, K.; Ohgata, K.; Takahashi, K. y Hattori, M. (1996).** Role of polysaccharide content and net charge on the emulsifying properties of β -lactoglobulin-carboxymethyl-dextran conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44, 2538-2543
- Nakai, S.; Li-Chan, E. y Hayakawa, S. (1986).** Contribution of protein hydrophobicity to its functionality. *Nahrung*. 30, 327-336.
- Nakai, T.; Otha, T., Hatsumi, M.; Horikoshi, S. (1975).** Isolation of N ϵ -(2-furoylmethyl)-L-lysine (furosine) from a acid hydrolyzate of casein heated with glucose. *Agricultural and Biological Chemistry*. 39, 2421-2422
- Nakamura, S.; Kato, A. y Kobayashi, K. (1991).** New antimicrobial characteristics of lysozyme-dextran conjugate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 39, 647–650.
- Narayan, K. y Cross, M. (1992).** Temperature influence on acetyllysine interaction with glucose in model systems due to Maillard reaction. *Journal of Food Science*. 57, 206-212.
- Nicoli, M.; Anese, M.; Parpinel, M.; Franceschi, S. y Lerici, C. (1997).** Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. *Cancer Letters*. 114, 71-74
- Nursten, H. (1980).** Recent developments in studies of the maillard reaction. *Food Chemistry* 6, 263-277
- Palazolo, G. (2006).** Formación y estabilidad de emulsiones o/w preparadas con proteínas nativas y desnaturalizadas de soja. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina.
- Palazolo, G.; Sorgentini, D. y Wagner, J. (2004).** Emulsifying properties and surface behavior of native and denatured whey soy proteins in comparison with other proteins. Creaming stability of oil-in water emulsions. *Journal of the American Oil of Chemists Society*. 81, 625–632
- Palazolo, G.; Sorgentini, D. y Wagner, J. R. (2005).** Coalescence and flocculation in o/w emulsions of native and denatured whey soy proteins in comparison with soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*. 19, 595–604.
- Panizzolo, L. A. (2005).** Modificación de proteínas por vía enzimática. Análisis de la relación estructura-funcionalidad de los productos de hidrólisis. Tesis, Facultad de Química, Universidad de la República. Uruguay.

-
- Papiz, M.; Sawyer, L.; Eliopoulos, E.; North, A.; Findlay, J.; Silvaprasadarao, R.; Jones, R.; Newcomer, M. y Kraulis, P. (1986).** The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*. 324, 383-385.
- Patton, S. (1955).** Browning and Associated Changes in Milk and Its Products: A Review. *Journal of Dairy Science*. 38, 457-478
- Pérez, M.; Villegas, C.; Sanchez, L.; Aranda, P.; Ena, J. y Calvo, M. (1989).** Interaction of fatty acids with β -lactoglobulin and albumin from ruminant milk. *Journal of Biochemistry*. 106, 1094-1097.
- Pérez, M.; Sanchez, L.; Aranda, P.; Ena, J.; Oria, R. y Calvo, M. (1992).** Effect of β -lactoglobulin on the activity of pregastric lipase. A possible role for this protein in ruminant milk. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1123: 151-155.
- Pham, C. y Cheftel, J. (1990).** Influence of Salts, Amino Acids and Urea on the Non-enzymatic Browning of the Protein-Sugar System. *Food Chemistry*. 37, 251-260.
- Phillips, L. (1981).** Protein conformation at liquid interfaces and its role in stabilizing emulsions and foams. *Food Technology*. 35, 50-57.
- Phillips, M. (1977).** The Conformation and Properties of Proteins at Liquid Interfaces. *Chemistry and Industry*. 5, 170-176.
- Phillips, L.; Whitehead, D. y Kinsella J. (1994).** Functional properties of proteins. En *Structure-function properties of food proteins*. Editado por Phillips, L. G.; Whitehead, D. M. y Kinsella, J. E. Academic Press, San Diego. 108-110.
- Pizzoferrato, L. y Manzi, P. (1998).** Maillard reaction in milk-based foods: Nutritional consequence. *Journal of Food Protection*. 61, 235-239
- Pokorný, J.; Pilková, L.; Davídek, J.; Valentová, H. (1988).** Effect of Amadori rearrangement products on the non-enzymic browning in model systems. *Die Nahrung* 32, 767-776
- Potman, R. y Van Wijk, A. (1989).** Thermal generation of aromas. Editado por T. H. Parlimen, R. McGorin y P. Chit. 182.
- Powel, W. y Spark, A. (1971).** Effects of Zirconium and Aluminium Compounds and pH on the Maillard Reaction. *J. Sci. Food Agric*. 22, 596-599.
- Prins, A. (1988).** Principles of foam stability. En: *Advances in Food Emulsions and Foams*. Editado por E. Dickinson y G. Stainsby. Elsevier. London. 91-122.
- Puff, N.; Cagna, A.; Aguié-Béguin V. y Douillard R. (1998).** Surface Dilatational Rheology of Proteins Adsorbed at Air/Water and

Oil/Water. *Interfaces Journal of colloid and interface science*. 208, 405-414.

- Puppo, M. C.; Speroni, F.; Chapleau, N.; de Lamballerie, M.; Añón, M. C. y Antón, M. (2005).** Effect of high-pressure treatment on emulsifying properties of soybean proteins. *Food Hydrocolloids*. 19, 289–296.
- Puyol, P.; Pérez, M.; Ena, J. y Calvo, M. (1991).** Interaction of Bovine β -Lactoglobulin and other bovine and human whey proteins with retinol and fatty acids. *Agricultural and Biological Chemistry*. 55, 2515-2520.
- Qi, X.; Brownlow, S.; Holt, C. y Sellers, P. (1995).** Thermal denaturation of β -lactoglobulin effect of protein concentration at pH-6.75 and pH-8.05. *Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1248, 43–49.
- Qi, X.; Holt, C.; McNulty, D.; Clarkece, D.; Brownlow, S. y Jonesce, G. (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
- Rada-Mendoza, M.; Villamiel, M.; Molina, E. y Olano, A. (2006).** Effects of heat treatment and high pressure on the subsequent lactosylation of β -lactoglobulin. *Food Chemistry*, 99, 651–655.
- Rawson, N. y Mahoney, R. (1983).** Effect of processing and storage on the protein quality of spray-dried lactose-hydrolysed milk powder. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 16, 313-316
- Razumovsky, L y Damodaran, S. (1999).** Surface activity—Compressibility relationship of proteins. *Langmuir*. 15,1392–1399.
- Relkin, P. y Sourdet, S. (2005).** Factors affecting fat droplet aggregation in whipped frozen protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*. 19, 503-511.
- Resmini, P.; Pellegrino, L. y Battelli, G. (1990).** Accurate quantification of furosine in milk and dairy products by a direct HPLC method. *Italian Journal of Food Science*. 3, 173–183.
- Robins, M. (2000).** Emulsions-creaming phenomena. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 5, 265-272.
- Roefs, S.; y de Kruif, C (1994).** A model for the denaturation and aggregation of b-lactoglobulin. *European Journal of Biochemistry*. 226, 883–889.
- Sakurai, K. y Goto, Y. (2006).** Dynamics and Mechanism of the Tanford Transition of Bovine b-Lactoglobulin Studied using Heteronuclear NMR Spectroscopy. *Journal of Molecular Biology*. 356, 483–496

-
- Salager, J. L.; Andérez, J. M. y Forgiarini, A. (2003).** Influencia de la formulación sobre las espumas. Cuaderno Firp 263-A. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Saltmarch, M. y Labuza, T. (1980).** Influence of relative humidity on the physico-chemical state of lactose in spray-dried sweet whey powders *Journal of Food Science*. 45, 1231-1236, 1242
- Sato, R.; Katayama, S.; Sawabe, T. y Saeki, H. (2003).** Stability and Emulsion-Forming Ability of Water-Soluble Fish Myofibrillar Protein Prepared by Conjugation with Alginate Oligosaccharide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 4376-4381.
- Sawyer, L. y Kontopids, G. (2000).** The core lipocalin, bovine α -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1482, 136-148.
- Schagger, H. y Von Jagow, G. (1987).** Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 KDa. *Analytical Biochemistry*. 166, 368-379.
- Scilingo, A. (2000).** Propiedades estructurales y funcionales de aislados proteicos de soja modificados. Efecto de la presencia de calcio. Tesis, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Shida, K.; Takamizawa, K.; Nagaoka, M.; Kusshiro, A. y Osawa, T. (1994).** Enterotoxin binding glycoproteins in protease-peptone fraction of heated bovine milk. *Journal of Dairy Science*. 77, 930-939
- Shu, Y.; Maki, S.; Nakamura, S. y Kato, A. (1998).** Double-Glycosylated Lysozyme at Positions 19 and 49 Constructed by Genetic Modification and Its Surface Functional Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 2433-2438
- Schubert, H. y Armbruster, H. (1992).** Principles of formation and stability of emulsions. *International Chemical Engineering*. 32, 14-28.
- Stacey, A.; Schnieke, A.; Kerr, M.; Scott, A.; McKee, C.; Cottingham, I.; Binas, B.; Wilde, C. y Colman, A. (1995).** Lactation is disrupted by α -lactalbumin gene replacement in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92, 2835-2839.
- Spies, J. (1976).** Milk allergy. *Journal of milk food technology*. 36, 225-231.
- Surroca, Y.; Haverkamp, J. y Heck, A. (2002).** Towards the understanding of molecular mechanisms in the early stages of heat-induced aggregation of β -lactoglobulin AB. *Journal of Chromatography A*, 1, 1-11.
- Swift, C. E.; Lockett, C. y Fryar, A. (1961).** Comminuted meat emulsions: capacity of meat for emulsifying fat. *Food Technology*. 15, 468-473.

-
- Tan, C. T. (1990).** Beverage emulsion. En Food emulsion. Editado por Friberg, S. y Larsson, K. Marcel Dekker, Inc.; New Cork, USA.
- Tcholakova, S.; Denkov, .N.; Sidzhakova,D.; Ivanov, I. y Campbell, B.; (2005).** Effects of Electrolyte Concentration and pH on the Coalescence Stability of β -Lactoglobulin Emulsions: Experiment and Interpretation. Langmuir, 21, 4842-4855.
- Tolstoguzov, V. (1993).** Functional properties of food proteins. Role of interactions in protein systems. En: Food Proteins. Structure and Functionality. Editado por Schwenke, K. D. y Mothes, R. VCH, Weinheim. 203-209.
- Tornberg, E. (1978).** Functional characterization of protein stabilized emulsions: emulsifying behaviour of proteins in a valve homogeniser. Journal of the Science of Food and Agriculture. 29, 867.
- Tornberg, E. (1979).** The adsorption behaviour of proteins at an interface as related to their emulsifying properties. Journal of the Science of Food and Agriculture. 76, 105-123.
- Tornberg, E. y Ediriweera, N. (1988).** Factors that influence the coalescence stability of protein-stabilized emulsion from the proportion of oil extracted by hexane. Journal of Science and Food Agriculture. 46, 93-113.
- Tornberg, E.; Granfeldt, Y. y Hakanson, C. (1982).** A comparison of the interfacial behavior of three food proteins absorbed at air water and oil water interfaces. Journal of the Science of Food and Agriculture. 33, 904-917.
- Tornberg, E. y Hermansson, A. (1977).** Functional characterization of protein stabilized emulsions. Effect of processing. Journal of Food Science 42, 468.
- Tornberg, E.; Olsson, A.; y Person, K. (1997).** The structural and interfacial properties of food proteins in relation to their function in emulsions. En Food Emulsions: Third edition, revised and expanded. Editado por Friberg, S. E. y Larsson, K. Marcel Dekker, Inc. New Cork, USA. 267-391.
- Van Aken, G.; Blijdenstein, T. y Hotrum, N. (2003).** Colloidal destabilisation mechanisms in protein-stabilised emulsions. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 8, 371-379
- Van Teeffelen, A.; Broersen, K. y De Jongh, H. (2005).** Glucosylation of β -lactoglobulin lowers the heat capacity change of unfolding: A unique way to affect protein thermodynamics. Protein Science. 14, 2187-2194.
- Verheul, M.; Roefs, S. y de Kruif, C. (1998).** Kinetics of heat induced aggregation of β -Lactoglobulin. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46, 896-903.

-
-
- Villamiel, M.; Arias, M.; Corzo, N. y Olano, A. (2000).** Survey of the furosine content in cheeses marketed in Spain. *Journal of Food Protection*. 63, 974-975.
- Wagner, J. R. (2000).** Propiedades superficiales. En: *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. Editado por Bartholomai, W. y Pilosof, A. M. R. Editorial EUDEBA, Argentina. 41-74.
- Wagner, J. R. y Guéguen, J. (1995).** Effects of dissociation, deamidation and reducing treatment on structural and surface active properties of soy glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43, 1993-2000.
- Wagner, J. R. y Guéguen, J. (1999a).** Surface functional properties of native, acid treated and reduced soy glycinin. 1. Foaming properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 2173-2180.
- Wagner, J. R.; y Guéguen, J. (1999b).** Surface functional properties of native, acid treated and reduced soy glycinin. 2. Emulsifying properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 2181-2187.
- Wagner, J. R.; Sorgentini, D. A. y Añón, M. C. (1996).** Thermal and electrophoretic behavior, hydrophobicity and some functional properties of acid-treated soy isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44, 1881-1889.
- Walstra, P. (1983).** Formation of Emulsions. En: *Encyclopedia of emulsion technology*. Editado por Becher, P. Marcel Dekker New York. 1, 57-127.
- Walstra, P. (1989).** Principles of foam formation and stability. En: *Foams: Physics, Chemistry and Structure*. Editado por Wilson, A. J. Springer-Verlag, London. 1-15.
- Walstra, P. (1993).** Principles of emulsion formation. *Chemical Engineering Science*. 48, 333-349.
- Walstra, P. (1996a).** Emulsion stability. En *Encyclopedia of Emulsion Technology*. Editado por Becher, P. Marcel Dekker, New York. 4, 1-62.
- Walstra, P. (1996b).** Dispersed systems: basic considerations. En: *Food chemistry*. Editado por Fennema, O. R. Marcel Dekker, New York. 95-155
- Walstra, P. (1999).** Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*. 9, 189-192
- Walstra, P y Jenness, R (1987).** *Química y Física Lactológica*. Editorial Acribia, S.A.; Zaragoza, España
- Wilde, P. (2000).** Interfaces: their role in foam and emulsion behavior. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 5, 176-181.

-
- Williams, A.; Janssen, J. J. M. y Prins, A. (1997).** Behaviour of droplets in simple shear flow in the presence of a protein emulsifier. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 125, 189-200.
- Wong, D. W. S. (1989).** Mechanism and Theory in Food Chemistry. Van Nostrand Reinhold, AVI, New York.
- Wooster, T. y Augustin, M. (2006).** β -Lactoglobulin–dextran Maillard conjugates: Their effect on interfacial thickness and emulsion stability. *Journal of Colloid and Interface Science* 303, 564–572.
- Wright, D. y Hemmant, J. (1987).** Foaming properties of protein solutions: Comparison of large-scale whipping and conductimetric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 41, 361-371.
- Wu, S.; Perez, MD.; Puyol, P y Sawyer, L. (1999).** β -Lactoglobulin Binds Palmitate within Its Central Cavity. *Journal of Biological Chemistry*. 274, 170–174.
- Wu, W.; Hettiarachchy, N. y Qi, M. (1998).** Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of soy protein peptides prepared by papain modification and ultrafiltration. *Journal of the American Oil of Chemists Society*. 75, 845-850.
- Ye, A. y Singh, H. (2001).** Interfacial composition and stability of sodium caseinate emulsions as influenced by calcium ions. *Food Hydrocolloids*. 15, 195-207.
- Yeboah, F.; Inteaz, A. y Yaylayan, V. (1999).** Reactivities of D-Glucose and D-Fructose during glycation of Bovine Serum Albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 3164-3172
- Yeboah, F.; Alli, I.; Yaylayan, V.; Konishi, Y. y Stefanowicz, P. (2000).** Monitoring glycation of lysozyme by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 2767-2774
- Yoshimura, Y.; Iijima, T.; Watanabe, T. y Nakazawa, H. (1997).** Antioxidant effect of Maillard reaction products using glucose-glycine model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45, 4106-4109
- Yu, M. y Damodaran, S. (1991).** Kinetics of destabilization of soy protein foams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 39, 1563–1567.

