



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
Instituto de Tecnología de Alimentos

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de Doctor en Química
En el campo de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**ESTUDIO DE PROPIEDADES Y ESTRUCTURA DE GELES
MIXTOS PROTEÍNA-POLISACÁRIDO. INFLUENCIA DE
LA REACCIÓN DE GLICOSILACIÓN**

Lic. María Julia Spotti

Director: **Dr. Carlos R. Carrara**

Codirector: **Dra. Amelia C. Rubiolo**

Miembros del Jurado:

Dra. María del Pilar Buera

Dra. Ana María R. Pilosof

Dr. Luis M. Gugliotta

Resumen

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de la reacción de Glicosilación (o de Maillard) sobre las características estructurales y capacidad gelificante de sistemas de proteínas de suero lácteo (WPI) y dextranos (DX).

Se estudiaron dos efectos de la reacción de Maillard sobre los sistemas WPI/DX: a) El efecto del tiempo de reacción, mediante sistemas WPI con DX de 15-25 kDa incubándolos a 2, 5 y 9 días; y b) el efecto del peso molecular del polisacárido involucrado, mediante sistemas de WPI con DX de 6, 40 y 70 kDa, incubándolos 5 días.

La capacidad gelificante y las propiedades mecánicas de los geles de WPI/DX conjugados se compararon con los mismos sistemas WPI/DX mixtos (sin reacción de Maillard).

Mediante electroforesis PAGE-SDS, determinación de grupos amino, color de los polvos glicosilados, absorbancia de los productos de reacción de Maillard (PRM), fluorescencia intrínseca y fluorescencia de los PRM se pudo comprobar que la reacción se llevó a cabo en todas las condiciones estudiadas y se pudo caracterizar a los PRM. La reacción tuvo mayor progreso con el aumento en la concentración de DX y el tiempo de incubación, así como con la disminución del peso molecular (PM) del DX.

Los ensayos de reología dinámica oscilatoria demostraron que la reacción afectó en gran medida las propiedades de gelificación de los sistemas. Tanto la temperatura como el tiempo de gelificación (obtenidos del cruce de G' y G'') se vieron afectados por la reacción de glicosilación, aumentando a medida que aumentaba el progreso de la reacción. Los valores del módulo elástico (G') fueron disminuyendo a medida que aumentaba concentración de DX y el tiempo de incubación, y disminuía el PM del DX. Estos

resultados estarían indicando un debilitamiento en la fuerza de gel de los sistemas conjugados con el progreso de la RM. Por el contrario, los geles mixtos mostraron un aumento en los valores de G' a medida que se incrementaba la concentración y el PM del DX. El espectro mecánico de geles mixtos y conjugados reveló que ambos tipos de geles son verdaderos, pero los geles conjugados son más débiles.

El ensayo de compresión uniaxial reveló un comportamiento muy diferente entre los sistemas en estudio. Los geles mixtos presentaron fractura en las condiciones de ensayo, mientras que los geles conjugados no, retornando a su forma original luego de la compresión. Por medio del módulo de Young, se pudo observar que los geles conjugados son menos firmes y duros. Los parámetros mecánicos de los geles mixtos revelaron que a mayor concentración y a mayor peso molecular del DX, mayor es el esfuerzo a la fractura (kPa), mientras que la deformación de Hencky no sufre muchos cambios.

Mediante microscopía láser confocal de barrido no se obtuvieron diferencias en la microestructura de geles de WPI y WPI/DX, mixtos y conjugados. Aunque los resultados de reología oscilatoria y compresión uniaxial inducen a concluir que los sistemas WPI/DX mixtos podrían presentar separación de fases, esto no es evidenciado en la escala de longitud del microscopio confocal (máxima resolución de 200nm). Tampoco se evidencian diferencias de estructura en los geles conjugados, probablemente debido a que la escala de medida no es la adecuada, quedando por aplicar en un futuro alguna herramienta microscópica que permita elucidar las estructuras de estos tipos de geles.

Estos resultados muestran que es posible obtener sistemas con propiedades gelificantes totalmente distintas, al aplicar una reacción que se produce espontáneamente en condiciones adecuadas, y que es segura desde el punto de vista alimentario.

Palabras claves: Proteínas de suero, Dextranos, Reacción de Maillard, Geles, Propiedades mecánicas.

Abstract

The aim of this work was to study the influence of glycosylation reaction (or Maillard reaction) on structural and gelling properties of isolate whey proteins (WPI) and dextrans (DX) systems.

The influence of two effects of the Maillard reaction on WPI/DX systems were studied: a) Effect of reaction time, by studying WPI/DX systems with a DX of 15-25 kDa incubated 2, 5 and 9 days; and b) the effect of polysaccharide molecular weight (MW), by studying WPI/DX systems with DX of 6, 40 and 70 kDa, incubated 5 days.

Gelling and mechanical properties of WPI/DX conjugate gels were compared with the same WPI/DX mixed systems (without Maillard reaction).

By applying the following techniques: SDS-PAGE, amino group determination, color of conjugate powders, absorbance of Maillard reaction products (MRP), intrinsic fluorescence of WPI and fluorescence of MRP, it was found that the reaction took place in all conditions studied. The reaction extent was increased with increasing DX concentration and incubation time, and it decreased with increasing MW of DX.

Dynamic oscillatory rheology tests showed that the reaction greatly affects gelation properties of the systems. Both temperature and time of gelation (obtained from crossing over of G' and G'') were affected by MR, increasing with the extent of the reaction. The values of elastic modulus (G') of conjugate gels were decreased with increasing concentration of DX and incubation time; whereas G' values increased with increasing MW of DX. Therefore, these results could indicate a weakening of the strength of the conjugate gels with the reaction progress. Conversely, the mixed gels showed an increase in their G'

values as concentration and MW of DX increased. Mechanical spectra of mixed and conjugate gels showed that both are true gels, but conjugate gels are weaker.

Uniaxial compression test revealed very different behavior between the two types of systems. Mixed gels showed fracture in the test conditions (80% deformation), whereas conjugate gels did not, returning to their original shape after compression. Through the Young's modulus, it was observed that conjugate gels are softer than mixed gels. Mechanical parameters of mixed gels revealed that the higher the molecular weight and the greater the concentration of DX, the higher the stress at fracture (kPa). Nevertheless, Hencky's strain at fracture did not change.

Using confocal laser scanning microscopy, differences in microstructure of WPI/DX mixed and conjugate gels were not observed. Although the information obtained by oscillatory rheology and uniaxial compression tests appear to indicate that WPI/DX mixed systems could present phase separation, this is not evidenced on the length scale of the confocal microscopy (maximum resolution of 200nm). Similarly, no differences are evident in the structure of conjugate gels, probably because this type of microscopy is not suitable for being applied in this study. Future work with other microscopic tools remains to be carried out to elucidate the structures of these types of gels.

These results show that it is possible to obtain gelling systems with completely different properties, by applying a reaction that occurs spontaneously under appropriate conditions and that is secure from the viewpoint of food safety.

Keywords: Whey Proteins, Dextrans, Maillard Reaction, Gels, Mechanical Properties.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

A mi director Carlos Carrara, por enseñarme y guiarme durante todo el doctorado, por sus consejos científicos y de la vida, el esfuerzo y el tiempo que dedicó para poder hacer posible este trabajo, y sobre todo por la contención recibida y la confianza que depositó en mí. A mi codirectora Amelia Rubiolo por sus aportes, predisposición y sugerencias.

A mis seres más queridos, mi familia. A mi papá, por estar conmigo en todos los momentos de mi vida y por la confianza y fe que me tenía; a Laura y Leti, que además de mis hermanas son las personas más adorables que conozco; a mi amor y compañero incondicional Juan Pablo, que me ayuda en todo momento, me aguanta y le da luz y alegría a mi vida. A toda mi familia: a mi abuela que me apoyo siempre, tíos de sangre y del corazón, primos, primas, y a mi familia política. A todos ellos por enseñarme, formarme y apoyarme en todo momento. Sin todos ellos no habría podido llegar a esta instancia.

A todas mis amigas y amigos por alegrarme en los momentos lindos y ayudarme en los momentos difíciles. A mis compañeros del doctorado, gracias por los lindos momentos compartidos en las clases, las mañanas y tardes de estudio con buena onda.

A todos los compañeros y amigos del laboratorio: Silvana Fioramonti, Martina Perduca, Virginia Castel, Javier Gazpoz, Adrián Pérez, Osvaldo Sponton, Romina Andermatten, Liliana Santiago, Oscar Andrich y Elena Aringoli, por los consejos, el cariño y la contención recibida durante estos años. A toda la gente del ITA y de la FIQ con quienes compartí todos estos años y me ayudaron de diferente manera en el desarrollo de la tesis.

A la Dra. María Julia Martínez y al grupo de trabajo del Departamento de Industrias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, por permitirme realizar las medidas reológicas, por el recibimiento, la ayuda y la amabilidad de todo el grupo de trabajo durante mi estadía.

A Andrea Piagentini (ITA-UNL) por la ayuda en las mediciones de color. A Jose M. Pellegrino (IFISE-CONICET) por su colaboración en la obtención de micrográficas confocales. A Mario Candiotti (INLAIN-CONICET) por su colaboración en la técnica de caracterización electroforética. A María Laura Olivares (INTEC-CONICET), Guillermo Sihufe (INTEC-CONICET) y Daniel Depiante (INTEC-CONICET), por asesorarme y ayudarme en varias cuestiones relacionadas con la tesis.

Al Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA) de la Facultad de Ingeniería Química (FIQ) y la Universidad Nacional del Litoral (UNL), por brindarme el espacio para desarrollar mis actividades de investigación. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET), por otorgarme las becas de postgrado para realizar el doctorado. A la Facultad de Ingeniería Química y a la Universidad de Buenos Aires por otorgarme la beca Inter-U que me ayudó a financiar mi estadía en Buenos Aires.

A mi papá

A Juan Pablo

ÍNDICE

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ÍNDICE | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 1.1. Las proteínas del suero lácteo | 7 |
| 1.1.1. Importancia nutritiva de las proteínas del suero | 10 |
| 1.1.2. Propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas del suero | 11 |
| 1.2. La gelificación..... | 13 |
| 1.2.1. Características de las proteínas relevantes en la gelificación..... | 15 |
| 1.2.2. Inducción de la gelificación | 16 |
| 1.2.2.1 Estructura de la red del gel..... | 19 |
| 1.2.2.2. Reversibilidad térmica | 23 |
| 1.2.3. Geles mixtos proteína/polisacárido | 23 |
| 1.2.3.1. Incompatibilidad termodinámica | 26 |
| 1.3. Modificación de las propiedades funcionales de proteínas..... | 29 |
| 1.4. La Reacción de Maillard | 30 |
| 1.4.1. Influencia de los productos de la reacción de Maillard sobre las propiedades funcionales de proteínas..... | 36 |
| 1.5. Polisacáridos | 38 |
| 1.6. Técnicas utilizadas durante el desarrollo de la tesis..... | 40 |
| 1.6.1 Técnicas para determinar el avance de la reacción de Maillard..... | 40 |
| 1.6.2. Fluorescencia del triptófano. Relación con los cambios conformacionales de las proteínas. | 41 |
| 1.6.3. Determinación de propiedades reológicas de los geles..... | 42 |
| 2. OBJETIVOS | 53 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 55 |
| 3.1. Materiales..... | 56 |
| 3.2. Generación de derivados conjugados y su caracterización. | 56 |
| 3.3. Estudio del comportamiento de los sistemas WPI/DX mixtos y conjugados, durante la desnaturalización térmica y gelificación. | 66 |
| 3.4. Obtención de geles mixtos y conjugados. | 69 |
| 3.5. Estudio de las propiedades mecánicas y texturales de geles..... | 69 |
| 3.6. Caracterización de la microestructura de los geles formados | 71 |
| 3.7. Análisis estadístico..... | 72 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 73 |
| 4.1. SISTEMA WPI/DX (15-25 kDa): Efecto de los días de reacción | 75 |
| 4.1.1. Electroforesis SDS-PAGE (sistemas conjugados DX 15-25 kDa) | 75 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.1.2. Cuantificación de grupos amino libres (sistemas conjugados DX 15-25 kDa)..... | 77 |
| 4.1.3. Determinación de parámetros de color (sistemas conjugados DX 15-25 kDa) | 79 |
| 4.1.4. Absorción UV-Vis (sistemas conjugados DX 15-25 kDa) | 82 |
| 4.1.5. Fluorescencia intrínseca (sistemas conjugados DX 15-25 kDa)..... | 86 |
| 4.1.6. Fluorescencia de productos de la reacción de Maillard (sistemas conjugados DX 15-25 kDa) | 88 |
| 4.1.7. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) (sistemas conjugados DX 15-25 kDa)90 | |
| 4.1.8. Reología Dinámica Oscilatoria (sistemas conjugados DX 15-25 kDa) | 92 |
| 4.1.8.1. Espectros mecánicos (sistemas conjugados DX 15-25 kDa) | 100 |
| 4.1.9. Propiedades mecánicas de geles WPI/DX | 104 |
| 4.1.9.1. Compresión uniaxial (sistemas mixtos y conjugados DX 15-25 kDa) | 104 |
| 4.1.9.2. Cálculo de tamaño de poro de geles WPI/DX (sistemas mixtos y conjugados DX 15-25 kDa) | 111 |
| 4.1.10. Microscopía Láser Confocal de Barrido (geles mixtos y conjugados con DX 15- 25 kDa)..... | 112 |
| 4.2. SISTEMA WPI/DX (6, 40 y 70 kDa): Efecto del peso molecular del dextrano | 115 |
| 4.2.1. Electroforesis SDS-PAGE (sistemas conjugados DX 6, 40 y70 kDa)..... | 115 |
| 4.2.2. Determinación de grupos amino libres (sistemas conjugados DX 6, 40 y70 kDa) | 117 |
| 4.2.3. Determinación de parámetros de color (sistemas conjugados DX 6, 40 y70 kDa) | 118 |
| 4.2.4. Absorción UV-Vis (sistemas conjugados DX 6, 40 y70 kDa)..... | 122 |
| 4.2.5. Fluorescencia intrínseca (sistemas conjugados DX 6, 40 y70 kDa) | 126 |
| 4.2.6. Fluorescencia de productos de la reacción de Maillard (sistemas conjugados DX 6, 40 y70 kDa)..... | 128 |
| 4.2.7. Reología Dinámica Oscilatoria (sistemas mixtos y conjugados DX 6, 40 y70 kDa) | 130 |
| 4.2.7.1. Espectros mecánicos (sistemas mixtos y conjugados DX 6, 40 y70 kDa)..... | 137 |
| 4.2.8. Propiedades mecánicas de geles WPI/DX (sistemas mixtos y conjugados DX 6, 40 y70 kDa)..... | 141 |
| 4.2.8.1. Tamaño de poro de geles WPI/DX (sistemas mixtos y conjugados DX 6, 40 y70 kDa)..... | 147 |
| 4.2.9. Microscopía Láser Confocal de Barrido de geles WPI/DX mixtos y conjugados (DX 6, 40 y70 kDa)..... | 148 |

| | |
|------------------------------------------------------------|------------|
| 5. CONCLUSIONES | 151 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 154 |
| 7. ANEXO | 183 |
| 7.1. Nomenclatura | 184 |
| 7.2. Listado de Figuras | 188 |
| 7.3. Listado de Tablas | 196 |
| 7.4. Trabajos publicados en revistas Internacionales | 198 |

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

En Argentina el sector lácteo es uno de los más importantes, con un impacto muy significativo en economías regionales y la nacional. Este sector destina la mayor parte de su volumen de producción a la industria quesera.

La leche está compuesta de 88,0% de agua, 3,2% de proteínas, 3,4% de lípidos, 4,7% de lactosa y 0,70 % de minerales, aproximadamente. Dentro del 3,2% de proteínas, el 80% corresponde a caseínas y el 20% a proteínas de suero, aproximadamente.

Durante la elaboración de quesos, se separa un líquido remanente del cuajo llamado suero. Hay dos tipos de suero: el *suero dulce*, que es obtenido luego de la coagulación enzimática de la leche por el cuajo a pH 6,6 y el *suero ácido*, que es obtenido de la producción de queso cottage y caseína ácida, luego de la coagulación ácida (Cayot & Lorient, 1997). Los dos tipos de suero tienen un contenido de proteínas que ronda los 6 g/l.

Las proteínas de suero son actualmente el componente del suero con mayor valor, ya que presentan propiedades funcionales específicas y un alto valor biológico, siendo por esto muy utilizadas como ingredientes en la industria alimentaria. Por esta razón, estas proteínas se han comenzado a recuperar del suero y a comercializar como concentrados o aislados, dependiendo de la concentración proteica final.

Los concentrados (Whey Protein Concentrate, WPC) son obtenidos por técnicas de ultrafiltración. Es posible obtener WPC en un amplio rango de concentraciones. Los más comercializados son los de menor concentración (cerca del 35%), los cuales se utilizan generalmente como sustitutos de la leche en polvo descremada en quesos, helados, derivados cárnicos y productos de panificación (Morr, Hoffmann & Buchheim, 2003), mientras que los de mayor concentración contienen un 80% de proteínas y se utilizan en variadas aplicaciones

dietéticas y destinadas a la nutrición de deportistas, en razón del excelente perfil de aminoácidos de las proteínas de suero (Ha & Zemelb, 2003).

Por otro lado, para la obtención de los aislados (Whey Protein Isolate, WPI), se emplean técnicas suplementarias tales como la cromatografía de intercambio iónico y la microfiltración, lo que permite concentrar aún más las proteínas hasta valores superiores al 90%.

1.1. Las proteínas del suero lácteo

Las proteínas de suero representan el 20% del total de las proteínas de leche (**Tabla 1.1**) y están representadas principalmente por β -lactoglobulina (β -lg) (50%), α -lactoalbúmina (α -lc) (20%), y en menor proporción por albúmina sérica bovina (ASB), inmunoglobulinas y proteínas menores (Cayot & Lorrient, 1997, de Wit, 1998).

Tabla 1.1. Contenido proteico del suero lácteo

| | (g/l) | |
|------------------------------|-------------|-------------|
| | Suero Dulce | Suero Ácido |
| Contenido Total de Proteínas | 6,7 | 5,8 |
| β -lactoglobulina | 3,5 | 3,5 |
| α -lactoalbúmina | 1,3 | 1,3 |
| Albúmina Sérica | 0,1 | 0,1 |
| Inmunoglobulinas | 0,4 | 0,4 |
| Lipoproteínas | 0,2 | |
| Proteosa Peptona | 0,2 | 0,2 |
| Glicomacropéptido | 1 | |

Tabla extraída de Oakenfull, Pearce & Burley (1997).

La β -lg tiene una masa molar de 18,3 kDa (**Figura 1.1.A**). Contiene 162 aminoácidos con un grupo tiol y dos puentes disulfuro. Entre siete variantes genéticas, las A y B son las más abundantes. Ellas difieren por dos residuos de aminoácidos (el residuo 64 es Asparagina para A y Glicina para B; el residuo 118 es Valina para A y Alanina para B). La estructura secundaria y terciaria muestra un grado de organización elevado con una gran proporción de hoja plegada β (43-50 % de los residuos) y sólo 10-15 % de α -hélice y 15-20 % de giros β (Papiz; Sawyer, Eliopoulos, North, Findlay, Sivaprasadarao, Jones, Newcomer & Kraulis, 1986). Tiene una estructura compacta debido a una pila de nueve hojas β y los dos puentes disulfuro. Esta estructura compacta es resistente a la proteólisis de las proteasas digestivas. Aunque la β -lg tiene muchos residuos hidrofóbicos es muy soluble en agua, ya que los residuos no polares se encuentran en el interior de la molécula, y la mayoría de los residuos polares están en su superficie (Mangino, 1984).

La forma monomérica de la β -lg se parece a un cono o cáliz con un bolsillo hidrofóbico capaz de unir vitamina A y ácidos grasos. Una de las principales características de esta proteína es la presencia de cinco residuos de cisteína (Cys) en su secuencia primaria: cuatro se encuentran formando puentes disulfuro intramoleculares (Cys₆₆-Cys₁₆₀; Cys₁₀₆-Cys₁₁₉), los cuales estabilizan la estructura terciaria de la proteína; y uno permanece con su grupo -SH libre (Cys₁₂₁) en el interior de la molécula. Este último podría facilitar la agregación de las proteínas a través de la formación de enlaces disulfuro covalentes intermoleculares durante el tratamiento térmico a altas temperaturas (Hoffmann & van Mil, 1997, Galani & Apenten, 1999).

A pH 5-8, la β -lg existe como dímero, constituido de conos apilados, es decir que al pH de la leche tiene esta conformación; a pH 3-5, los dímeros se asocian para formar octámeros, y a valores de pH extremos (<2, >8), la β -lg existe como monómero (Pessen, Purcell & Farrell, 1985).

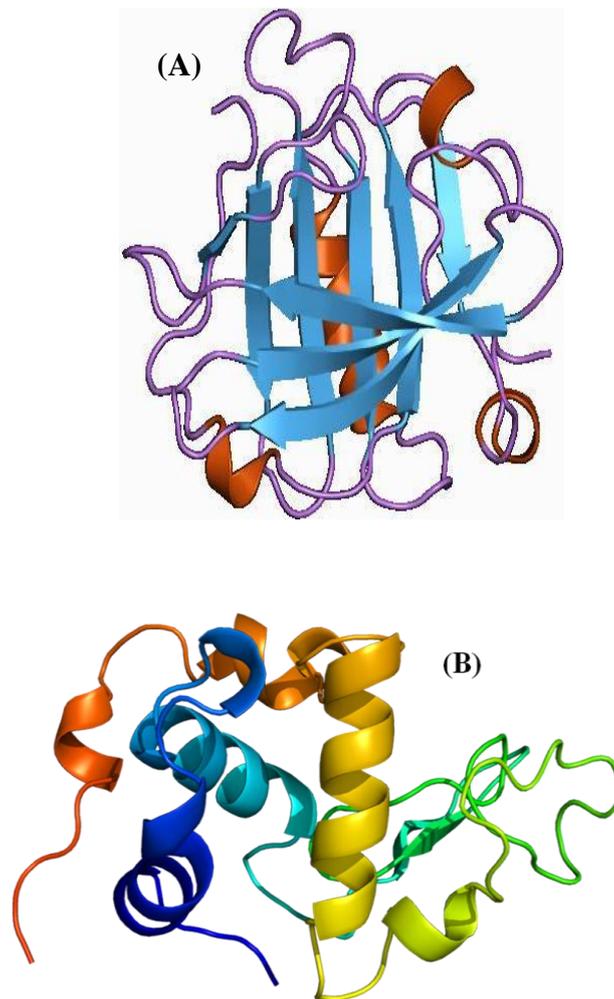


Figura 1.1. (A) β -lactoglobulina y (B) α -lactoalbúmina de suero de leche (imagen extraída de <http://bioagroin.blogspot.com.ar/2011/05/lactoalbumina.html>)

La α -lc (**Figura 1.1.B**) es una pequeña proteína con 123 aminoácidos y 4 puentes disulfuro, y tiene una masa molar de 14,2 kDa (Vanaman, Brew & Hill, 1970; Brew, Castellino, Vanaman & Hill, 1970). Las dos variantes genéticas A y B difieren entre ellas por un residuo en la posición 10, siendo Glutamina para A y Arginina para B. Esta proteína tiene una estructura secundaria poco organizada: 30 % de α -hélice y 9 % de hoja plegada β , como resultado, tiene una gran flexibilidad. Sin embargo, la presencia del ión calcio y 4 puentes disulfuro mantienen su estructura elipsoidal compacta con una pequeña caja hidrofóbica. Su estabilidad conformacional está relacionada a su capacidad de unir el calcio. A $\text{pH} < 4$, el

calcio es liberado, y la apo α -lc se vuelve flexible y vulnerable a proteólisis. La α -lc es altamente soluble, incluso en su punto isoeléctrico (pI), y su solubilidad no es muy influenciada por variaciones en la fuerza iónica o cambios de pH (Cayot & Lorrient, 1997).

1.1.1. Importancia nutritiva de las proteínas del suero

La evidencia más contundente de la importancia nutritiva de proteínas de suero lácteo es la constatación de que presenta elevado valor biológico, incluso superan el valor biológico de proteínas de huevo, como lo demuestra el hecho de que 17,4 g de proteínas de huevo son necesarias para satisfacer los requerimientos diarios de aminoácidos esenciales, mientras sólo se requiere 14,5 g de proteínas del lactosuero, encontradas en el suero nativo (Archibald, 2008).

Además, el perfil de aminoácidos de las proteínas del suero presenta considerables cantidades de aminoácidos esenciales, aminoácidos sulfurados y aminoácidos de cadena ramificada. Dichos aminoácidos son los principales responsables del excelente índice PER (del inglés Protein Efficiency Ratio), que es un indicador del grado de eficiencia de una proteína y de la amplia gama de aplicaciones de las proteínas del suero. Además, contienen una cantidad elevada de aminoácidos limitantes: fenilalanina y tirosina, si se expresa como un porcentaje de su proporción en proteínas de huevo, constituye el 71-75% (Archibald, 2008). Debido a su alto contenido en Lisina (aminoácido esencial), son adecuadas para suplementar productos a base de cereales.

En los últimos años se han logrado avances importantes referidos a las características alimenticias y biológicas de las proteínas de suero (Ha & Zemelb, 2003). Particularmente en el artículo de Madureira, Pereira, Gomes, Pintado & Malcasa (2007), se citan numerosos artículos científicos sobre investigaciones relativas a los beneficios sobre la salud y a la prevención de enfermedades de estas proteínas. Entre los cuales pueden citarse la acción

antimicrobiana y viral que presentan la inmunoglobulina, lactoferrina, lactoperoxidasa y el glicomacropéptido, que a través de distintos mecanismos actúan como bactericidas, bacteriostáticos, inhibiendo el desarrollo de distintos tipos de bacterias y virus que pueden causar enfermedades e intoxicaciones alimentarias.

Además ciertos compuestos y aminoácidos derivados de estas proteínas, también se presentan como bioactivos (Ha & Zemelb, 2003). Se ha encontrado funciones asociadas al sistema inmune en atletas sometidos a entrenamientos intensivos. Estos entrenamientos implican esfuerzos físicos excesivos, que pueden tener un efecto inmunosupresor, pudiendo dar lugar a infecciones de las vías respiratorias, afectar el funcionamiento gastrointestinal y aumentar la producción de radicales libres en las células. La ingesta de estas proteínas como suplemento dietarios disminuiría estos efectos (Madureira et al., 2007).

También se ha encontrado evidencias de que determinados compuestos bioactivos de las proteínas del suero pueden ejercer un efecto positivo en la salud cardiovascular. Las mismas tendrían un efecto inhibitor sobre la actividad de la enzima transformadora de la angiotensina, que constituye uno de los mecanismos de regulación de la presión sanguínea, además de poseer actividad antitrombótica y contribuir a la reducción de la tasa de colesterol en sangre (Madureira et al., 2007).

1.1.2. Propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas del suero

Las propiedades funcionales definen el comportamiento de las proteínas en los alimentos y refleja la manera en la cual las proteínas interactúan con otros componentes de un alimento, tales como lípidos, azúcares, sales y otras proteínas. El término funcionalidad, que es aplicado a ingredientes alimenticios, ha sido definido como “cualquier propiedad más allá de los atributos nutricionales que influencia la utilidad de un ingrediente en los alimentos (Boye, Ma & Harwalkar, 1997).

Las funciones típicas de las proteínas en los alimentos incluyen: gelificación, emulsificación, espumado, textura, absorción de agua, adhesión y cohesión, y absorción y retención de lípidos y flavour (Martinez, 2010), entre otras. Como se dijo anteriormente, las proteínas del lactosuero son muy usadas como ingredientes alimenticios, ya que presentan muchas de estas propiedades funcionales.

Las propiedades funcionales de las proteínas del lactosuero involucradas en algunos sistemas alimentarios y la forma de acción se encuentran en la **Tabla 1.2**.

Tabla 1.2. Algunas propiedades funcionales de proteínas de suero en la industria alimentaria.

| Alimento | Propiedades funcionales esperadas | Proteínas usadas |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Pan | Retención de agua | WPC |
| galletitas | Dispersión de grasas | WPI |
| Cereales de desayuno | Estabilización de emulsiones y espumas Propiedades gelificantes Pardeamiento | WPI, suero |
| Productos de panadería y chocolates | Estabilización de emulsiones y espumas Propiedades gelificantes Pardeamiento y producción de aromas | WPC |
| Helados | Espumas/ aireación Gelificación y desarrollo de textura | WPC |

Extraído de Cayot & Lorrient (1997).

Como se puede observar, los preparados proteicos además de estabilizar sistemas dispersos tales como geles y espumas, demostraron tener buenas propiedades hidrofílicas

(solubilidad, capacidad de unión y retención de agua) como también hidrofóbicas (formación y estabilización de emulsiones, capacidad de unión y retención de grasas).

Las propiedades funcionales de las proteínas están relacionadas a sus propiedades físicas, químicas y conformacionales (Damodaran, 1997), como su carácter anfifílico, actividad superficial, peso molecular, carga neta, solubilidad y flexibilidad conformacional (Morr & Ha, 1993; Bryant, Cory & McClements, 1998; Foegeding, Davis, Doucet, & McGuffey, 2002). Por lo tanto, ellas dependen no solo de sus propiedades intrínsecas, sino también de los cambios en su conformación, por lo que son muy importantes las condiciones extrínsecas del medio acuoso tales como pH, fuerza iónica y temperatura. El conocimiento de la relación entre las propiedades intrínsecas de las proteínas y los factores extrínsecos tales como temperatura, pH, sales, y concentración de proteína es muy importante para deducir y controlar las propiedades funcionales (Martinez, 2010).

La gelificación de las proteínas de suero lácteo es una de las propiedades funcionales más destacadas. Muchos alimentos populares como postres tipo gelatina, embutidos, análogos de pescados tipo surimi, son alimentos basados en geles. Es por esto que a continuación se hará énfasis en esta propiedad funcional.

1.2. La gelificación

La palabra “jelly” que significa jalea o gelatina, apareció por primera vez en el siglo XIV, y fue derivado del francés *gelée*, que significa helado, al latín *gelare*, que significa congelar. El término científico de la palabra “gel” fue introducido por Thomas Graham (~1869), quien fue el padre de la química de coloides (Alting, 2003). Desde ese momento, muchas definiciones de gel han sido dadas por la literatura. Hace 20 años se definió como “un sistema de características sólidas, en la cual las partículas coloidales de alguna manera constituyen una estructura coherente” (Oakenfull et al., 1997).

Los geles son soluciones acuosas o dispersiones de carbohidratos o proteínas de alto peso molecular, que están unidas en una red molecular interconectada que extiende el volumen de líquido del medio (Oakenfull et al., 1997; Foegeding, 2010).

Como se pudo conocer de estudios de light scattering y microscopía, la gelificación involucra la agregación de partículas coloidales. Más allá de eso, hay una aceptación de que los geles presentan estructuras ramificadas tridimensionales más o menos coherentes que retienen el componente líquido y confiere elasticidad y rigidez al sistema como un todo (Stading & Hermansson, 1991). En los geles alimenticios este líquido es invariablemente agua, la red molecular consiste de proteínas y polisacáridos o una combinación de los dos. Las propiedades del gel son los resultados netos de las complejas interacciones entre el solvente y la red molecular. El agua, como solvente, influencia la naturaleza y la magnitud de las fuerzas intermoleculares que mantienen la integridad de la red del polímero; la red del polímero mantiene el agua, previniendo que ésta fluya (Oakenfull et al., 1997). La gelificación es una importante propiedad comúnmente usada en la industria alimenticia, por lo que los factores que la afectan han sido y son estudiados extensamente (Aguilera, 1995; Boye et al., 1997).

Las dos teorías que más se han utilizado para interpretar los resultados experimentales de estudios en geles son: la teoría clásica desarrollada por Flory & Stockmayer (1953; 1974), y la teoría de la percolación, desarrollada por de Gennes (1979). Estas dos teorías son capaces de predecir un punto crítico en el cual se produce un *cluster* infinito. Según el modelo de Flory & Stockmayer, la gelificación es un evento súbito que ocurre cuando es alcanzado un valor crítico de entrecruzamiento en el polímero, llamado punto gel, en el cual la viscosidad diverge a infinito. En la teoría de la percolación se asume que los monómeros forman agregados pequeños y que, en un cierto punto, se llega al punto gel en el cual los agregados se entrecruzan (Martinez, 2010).

1.2.1. Características de las proteínas relevantes en la gelificación

Para formar un gel, los materiales alimenticios deben contener moléculas capaces de formar uniones (cross-linking) en tres dimensiones. Por su química, las proteínas tienen muchas ventajas para este propósito. Las propiedades de las proteínas importantes en la gelificación son la flexibilidad, incluyendo su habilidad para desnaturalizar y dar cadenas extendidas, y especialmente, su habilidad para formar redes extensas por entrecruzamiento. Es por esto que para lograr la gelificación de las proteínas de suero (como de cualquier proteína globular) se debe lograr un desplegamiento parcial o total de las moléculas proteicas (Ould Eleya & Turgeon, 2000). Este proceso se llama desnaturalización y afecta la estructura terciaria de la proteína. La desnaturalización de las proteínas globulares es un prerrequisito para “activar” la funcionalidad deseada y proporcionar las propiedades sensoriales y texturales esperadas en los alimentos (Alting, 2003).

Durante la desnaturalización, las proteínas se someten a un desplegamiento de sus estructuras tridimensionales para dar cadenas extendidas, pero sin ruptura de uniones covalentes. Debido a esto, se altera el balance entre las diferentes fuerzas que mantienen a la proteína en su estado nativo, como interacciones electrostáticas, puentes hidrógeno, puentes disulfuro, interacción dipolo-dipolo, interacciones hidrofóbicas, etc.

La desnaturalización expone, al menos, algunos grupos de las partes hidrofóbicas de la molécula al solvente. Cuando los aminoácidos no polares con grupos antes ocultos son expuestos a través del desplegamiento o reacomodamiento de la estructura molecular, las interacciones intermoleculares toman lugar. Así, las regiones de la molécula originalmente involucrada en mantener la estructura de la proteína nativa, se vuelve disponible para uniones intermoleculares (Perez, Wargon & Pilosof, 2006).

La desnaturalización completa no es necesaria para que ocurra la formación del gel, es más, a menudo proteínas completamente desnaturalizadas forman precipitados insolubles por

la gran cantidad de interacciones hidrofóbicas y puentes hidrógenos entre cadenas desplegadas. La gelificación ocurre especialmente en el límite de la agregación y la solubilidad. La desnaturalización total de las proteínas solo ocurre en presencia de desnaturalizantes fuertes como urea o guanidina. La desnaturalización por calor o ácidos generalmente no genera proteínas totalmente desplegadas, y a menudo retienen la mayor parte de estructura nativa (Hermansson, 1978).

1.2.2. Inducción de la gelificación

El mecanismo aceptado clásicamente para describir la desnaturalización térmica y agregación de proteínas globulares es el siguiente (Morr & Ha, 1993):

1. Primero se produce un debilitamiento y ruptura de uniones disulfuro e hidrógeno, de modo de alterar la conformación nativa de las proteínas, y desplegarlas. En el caso de la β -lg que puede existir en forma de monómero, dímero u octámero, antes de la desnaturalización se produce la disociación de estas formas en monómeros. Cerca del pH neutro y a 25°C, la β -lg en solución existe en equilibrio dinámico entre su forma dimérica (en la cual los monómeros no están unidos covalentemente) y su forma monomérica (Damodaran, 1997; Mc Kenzie, 1971). Varios autores han sugerido que la disociación del dímero es un paso necesario en el proceso de desnaturalización térmica (Cairolì, Iametti & Bonomi, 1994; Iametti, De Gregori, Vecchio & Bonomi, 1996) y esta reacción es favorecida durante el calentamiento a pH neutro (Hoffman & Van Mil, 1999). Si el calentamiento prosigue se produce la ruptura de uniones covalentes y exposición de grupos tiol y grupos hidrofóbicos, que estaban previamente en el interior de la molécula (Mc Kenzie & Sawyer, 1967; Iametti et al., 1996; Relkin, 1996; Qi Holt, McNulty, Clarke, Brownlow & Jones, 1997; Hoffmann & Van Mil, 1999, Boye et al., 1995; Baeza & Pilosof, 2001; Spahn, Baeza, Santiago & Pilosof, 2008).

2. Una vez expuestos estos grupos, ocurre agregación de las proteínas desplegadas mediante interacciones entre los grupos expuestos (Mangino, 1992; Morr & Ha, 1993; Aguilera, 1995; Relkin, 1996; Hoffmann., Sala, Olieman & de Kruif, 1997; Hoffmann & Van Mil, 1999; Pérez, et al., 2006). La agregación de la proteína depende principalmente de su concentración y del pH (Verheul, Roefs, Mellema & de Kruif, 1998). Si el tiempo de calentamiento y la concentración de la proteína son suficientes, se promueve la polimerización de las proteínas desplegadas para producir una estructura tridimensional (gel). Los geles térmicos de proteínas de suero lácteo a pH neutro se producen cuando la concentración de proteínas está por arriba de la concentración crítica ($\geq 9\%$), y se les aplica tratamiento térmico por encima de su temperatura de desnaturalización ($\geq 68^\circ\text{C}$).

La estabilidad de las estructuras de proteínas surge de la combinación de uniones covalentes con interacciones no covalentes (Oakenfull et al., 1997). Hay cuatro tipos de interacciones moleculares que pueden estar presentes en la formación de geles de las proteínas de suero:

- Interacciones hidrofóbicas (5-10 kJ/mol).
- Puentes hidrógeno (10-40 kJ/mol).
- Interacciones electrostáticas (25-80 kJ/mol).
- Uniones covalentes (200-400 kJ/mol).

Las principales uniones covalentes que se producen en las cadenas que unen proteínas son puentes disulfuro de los residuos de cisteína. Estas estabilizan la estructura de muchas proteínas y proporcionan al gel elevada resistencia, pero pueden romperse por compuestos que contienen sulfhidrilos y algunos otros agentes reductores. Se forman rápidamente por oxidación leve de los grupos sulfhidrilos, por ejemplo:



La habilidad de los puentes disulfuro para sufrir intercambios sulfhidrilo-disulfuro le confiere a la estructura proteica flexibilidad (Oakenfull et al., 1997):



Otras uniones covalentes que no sean puentes disulfuro son menos frecuentes en proteínas. Se produce cross-linking entre residuos glutamil y lisil, a veces conocido como uniones isopéptidos, las cuales son producidas por la enzima transglutaminasa, y también otras uniones involucrando residuos de lisina, producida por la enzima lisil-oxidasa.

Los enlaces no covalentes son relativamente débiles, aunque colectivamente ellos confieren una gran fuerza (Mangino, 1992; Morr & Ha, 1993; Hoffman et al., 1997). Las interacciones hidrofóbicas son muy importantes en la agregación y formación del gel. Los puentes electrostáticos pueden ser más fuertes que otras uniones no covalentes, pero su existencia es determinada por el pH y concentración de sales (fuerza iónica). La formación de la red tridimensional final implica también enlaces puente hidrógeno, que se favorecen durante el enfriamiento. Por esto mismo, las fuerzas involucradas en mantener el estado nativo de las proteínas también son las responsables de la formación de agregados (Boye et al., 1997; Altung, 2003).

Si bien el estado gelificado final está formado por agregados de proteína principalmente desnaturalizada, el tipo de uniones que forman los agregados y el tamaño y forma de los mismos va a depender de las condiciones de obtención del gel, pudiendo producir así diferentes tipos de geles.

Si bien la gelificación inducida por calor es el método más comúnmente estudiado para obtener geles de proteínas globulares (Walsh-O`Grady, O`Kennedy, Fitzgerald & Lane, 2001; Ikeda, 2003; Donato, Garnier, Novales, Durand & Doublier, 2005; Fitzsimons,

Mulvihill & Morris, 2008), las proteínas pueden ser desnaturalizadas en diferentes modos. Se ha estudiado la gelificación mediante tratamiento con alta presión (Ipsen, Otte, Dominguez, & Qvist, 2000), y por procesos de gelificación en frío inducidos por sales o ácidos (Alting, Hamer, de Kruif, & Visschers, 2000). Este último método de obtención requiere de dos pasos, uno para desnaturalizar parcialmente a las proteínas y otro para inducir la reticulación de la red del gel. También se han estudiado métodos químicos, como la utilización de enzimas transglutaminasas, aunque se ha usado en proteínas con estructuras más abiertas que las proteínas de suero, como son las caseínas (Alting, 2003).

1.2.2.1 Estructura de la red del gel

Esencialmente, la estructura de la red del gel va a estar influenciada por tres factores:

Hay tres factores principales que determinan la naturaleza de los geles formados:

- 1) Condiciones del medio ambiente: pH, fuerza iónica, cantidad de minerales (Ould Eleya & Turgeon, 2000).
- 2) Composición proteica: grado de desnaturalización y concentración.
- 3) Condiciones de procesamiento: velocidad de calentamiento-enfriamiento (Aguilera, 1995, Hines & Foegeding, 1993).

Las proteínas globulares se pueden agregar y formar una red de gel en sólo dos modos. Una es por agregación de proteínas globulares al azar que pueden dar una estructura de red puramente estadística (Tombs, 1974). Los agregados al azar han sido observados en geles inducidos por ácido de caseínas. La otra es por una agregación más ordenada que da lugar a una estructura de red tipo “collar de perlas” (Doi, 1993). Estas han sido observadas en geles inducidos por calor de albúmina sérica bovina, lisozima y ribonucleasa. Ejemplos de estos tipos de estructura se puede observar en la **Figura 1.2**.

Clark, Judge, Richards, Stubbs, & Suggett (1981) usaron modelos de computadora para estudiar estos dos tipos de agregación en detalle y concluyeron que la diferencia entre la agregación ordenada y al azar no es clara. La red del gel no es definida en un sentido geométrico, y las diferencias entre la agregación al azar y más ordenada dependen de los sitios de unión disponibles por molécula de proteína desplegada, su distribución espacial, y su fuerza de unión relativa.

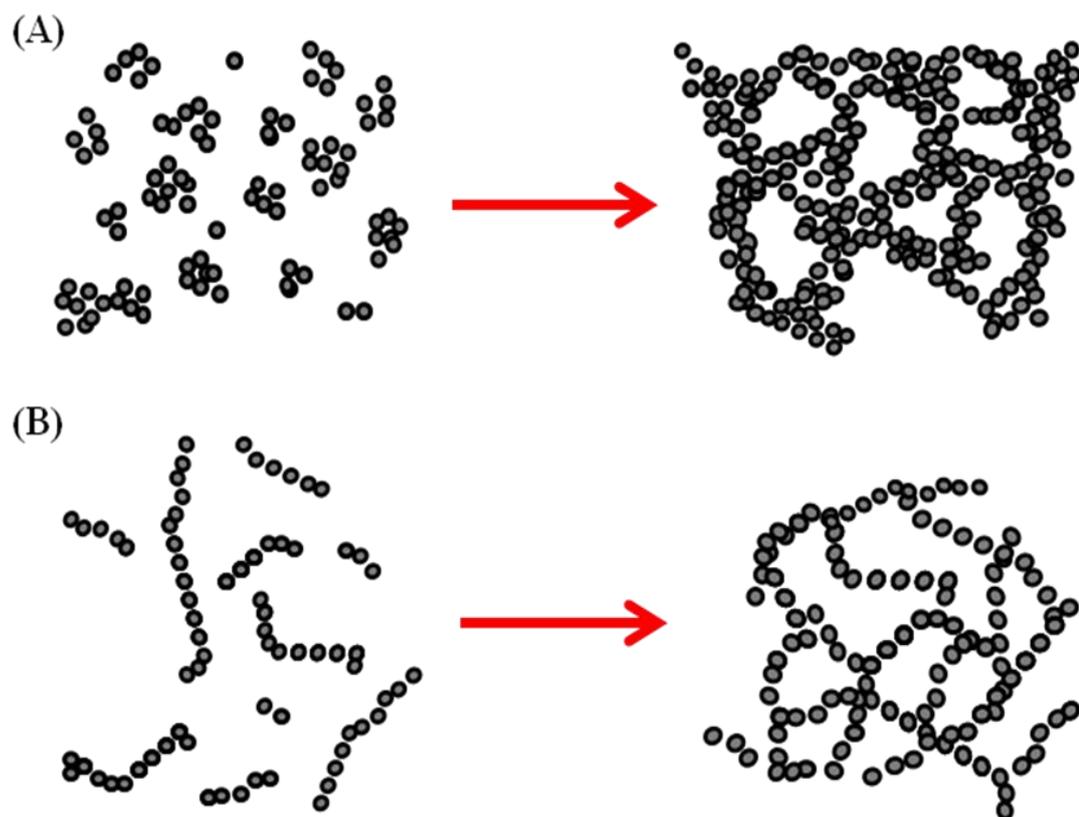


Figura 1.2. Dos tipos de geles formadas por la agregación de proteínas globulares (A) Agregación al azar. (B) Agregación de collar de perlas (adaptado de Oakenful et al., 1997).

Algunas proteínas, como la β -lg y ovoalbúmina, pueden formar un gel u otro, dependiendo del pH y la fuerza iónica (Oakenfull et al., 1997).

En condiciones más favorables a la desnaturalización o desdoblamiento de la proteína que a la agregación de la misma (pH por encima o por debajo del pI de la proteína, fuerzas iónicas débiles) se liberan los grupos tiol internos y se promueve la formación o intercambio de uniones disulfuro entre moléculas vecinas, lo que lleva a la formación de agregados lineales. Estos geles se llaman de filamentos finos (o finas hebras, del inglés “fine-stranded” también llamado collar de perlas o geles verdaderos). Este nombre deriva de la observación de de estos geles mediante microscopía electrónica de transmisión, donde de la microestructura se distingue como hebras de varias longitudes con diámetros de una a varias moléculas (Foegeding, 2010). Así, los geles de filamentos finos están formados por una red muy ordenada de moléculas de proteína y el grosor de los filamentos es muy pequeño (**Figura 1.3 A**), de tal forma que estos geles son transparentes (Kavanagh, Clark & Ross-Murphy, 2000; Pilosof, 2000).

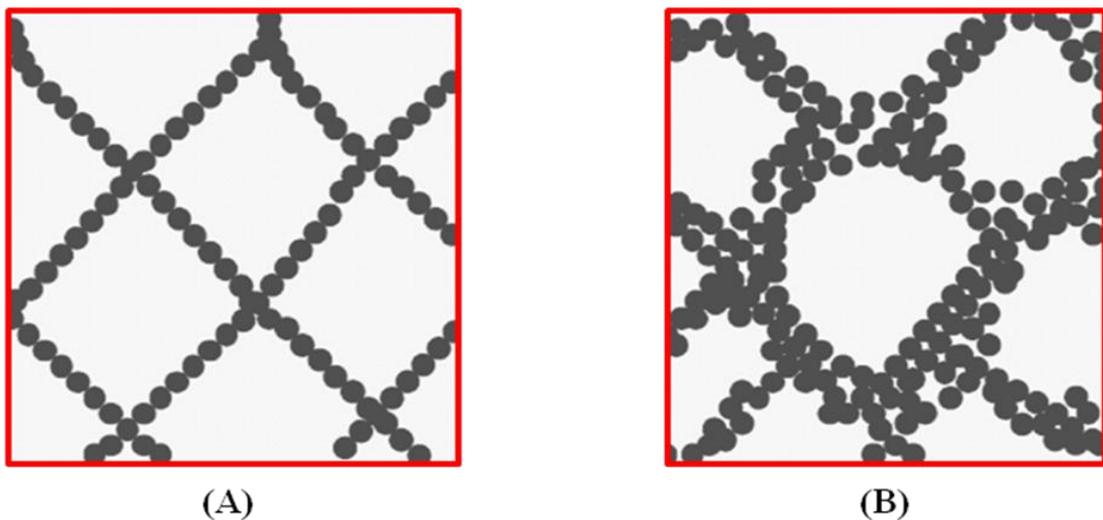


Figura 1.3. Esquema de los diferentes tipos de microestructura de geles de proteínas globulares: (A) de filamentos finos, (B) geles agregados o particulados (adaptado de Pilosof (2000)).

Cuando las condiciones favorecen las interacciones proteína–proteína en solución, como ser pH cercano al pI de la proteína, presencia de una considerable concentración de sales, o a bajas temperaturas de calentamiento (Verheul, Pedersen, Roefs & de Kruif, 1999) se puede dar lugar a la formación de agregados de proteínas previamente a la desnaturalización (Stading & Hermansson, 1990; Baeza, Gugliota & Pilosof, 2003), y luego se dará la desnaturalización de los agregados formados. Estos geles se llaman geles agregados o particulados (Pilosof, 2000), tienen una estructura tridimensional abierta y desordenada, son opacos y tienen menor capacidad de retención de agua.

Los geles opacos se forman cuando las fluctuaciones en la densidad del polímero se acercan al tamaño macroscópico y efectivamente dispersa la luz. Tales redes están caracterizadas por regiones de alta concentración de polímeros separadas por regiones casi desprovistas de los mismos (Oakenfull et al., 1997) (**Figura 1.3 B**).

En resumen, los geles β -lg pueden cambiar de filamentos finos (transparentes) a particulados (opacos) dependiendo de la fuerza iónica y el pH (Stading & Hermansson, 1990), como se ilustra en la **Figura 1.4**.

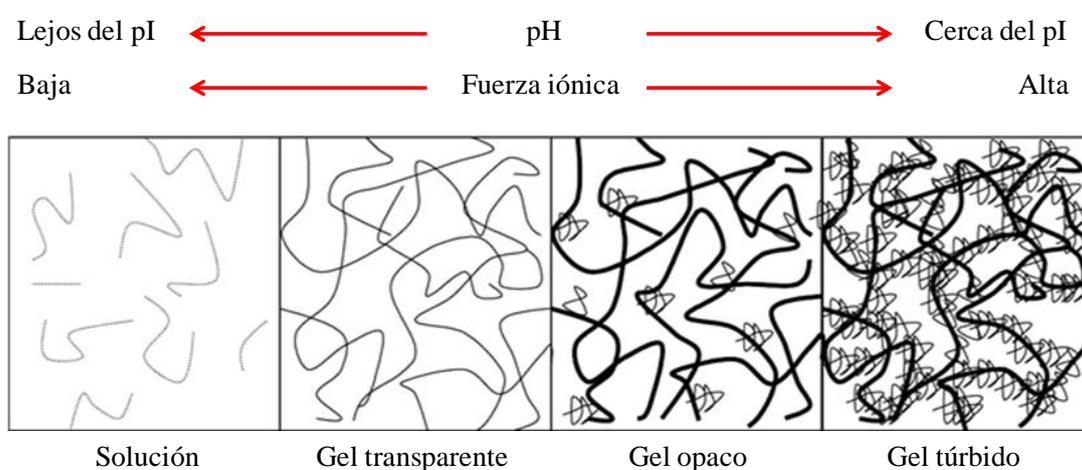


Figura 1.4. Relación entre la apariencia del gel y la modulación de la repulsión electrostática.

Figura adaptada de Doi & Kitabatake (1997).

Los geles particulados se forman a pH intermedios (4-6) y a alta fuerza iónica, y los geles de finas hebras se forman por arriba y por debajo de ese intervalo de pH y a baja fuerza iónica (Stading & Hermansson, 1990; Mleko & Foegeding, 2000).

1.2.2.2. Reversibilidad térmica

Los geles de proteínas son casi térmicamente irreversibles (a diferencia de muchos geles de polisacáridos que revierten su estado de gel con calentamiento). Si se forma un gel cuando una solución de proteínas se calienta, el enfriamiento o un futuro calentamiento no revierte el proceso (Oakenful et al., 1997). Un ejemplo familiar es una clara de huevo gelificada en un huevo hervido.

En principio, la desnaturalización por calor de las proteínas es un proceso reversible. A cada temperatura existe un equilibrio específico entre proteínas en el estado nativo y proteínas en el estado desnaturalizado. Cuando las proteínas desnaturalizadas comienzan a agregarse, se desnaturalizan más moléculas de proteína nativa para restablecer el equilibrio, hasta el punto donde ya no quedan más moléculas nativas. Es decir que la agregación proteica y la gelificación, en particular la formación de puentes disulfuro intermoleculares, previenen la renaturalización de las moléculas de proteínas desplegadas después del enfriamiento. En la práctica esto significa que la desnaturalización por calor de las proteínas es un proceso irreversible (Renkema & van Vliet, 2002).

1.2.3. Geles mixtos proteína/polisacárido

Hasta ahora hemos visto geles proteicos, pero los componentes mayoritarios de los productos alimenticios semisólidos, como postres, carnes procesadas, embutidos, etc son las proteínas y los polisacáridos (Tolstoguzov, 1986), donde ambos tipos de macromoléculas

contribuyen a la textura, estructura y estabilidad de los alimentos a través de sus propiedades de superficie, comportamiento de gelificación, thickening y otros (Doublier, Garnier, Renard & Sánchez, 2000).

Casi todos los geles alimenticios contienen mezclas complejas de diferentes proteínas o proteínas en combinación con polisacáridos. Las propiedades físicas y fisicoquímicas de estos productos pueden ser bien aproximadas por sistemas gelificantes mixtos, donde la combinación de proteínas nativas o desnaturalizadas con polisacáridos aniónicos o neutros dan un gran número de geles mixtos con diferentes propiedades físicas y estructurales (Brownsey & Morris, 1988; Tolstoguzov, 2000; de Jong & van de Velde, 2007).

La presencia de polisacáridos puede disminuir la concentración de proteína mínima necesaria para gelificar (o concentración crítica) (Ndi, Swanson, Barbosa-Canovas & Luedecke, 1996; Zasytkin, Dumay & Cheftel, 1996; Turgeon & Beaulieu, 2001), disminuir la temperatura o tiempo de gelificación respecto a los geles de proteína sola (Bryant & McClements, 2000), modificar la textura de los geles obtenidos (Olsson, Langton & Hermansson, 2002; Zasytkin et al., 1996), producir cambios en la microestructura y apariencia del gel resultante (Dickinson, 1993; Zasytkin et al., 1996), y modificar la capacidad de retención de agua del mismo (Beaulieu, Turgeon & Doublier, 2001).

En sistemas en solución, la interacción entre proteínas y polisacáridos puede resultar en una de las siguientes consecuencias:

1. Co-solubilidad: en donde no hay interacción significativa entre las dos clases de moléculas poliméricas y ambas coexisten en solución.
2. Incompatibilidad: donde la repulsión entre los dos tipos de polímeros causa la formación de fases separadas.
3. Acomplejamiento: donde la atracción entre las dos moléculas causa la formación de una sola fase o precipitado.

La co-solubilidad generalmente se observa cuando ambos biopolímeros se encuentran en concentraciones diluidas.

El acomplejamiento se produce en sistemas polianión-policación, donde los dos polímeros se pueden asociar en una sola fase y/o formar un precipitado, según las concentraciones de ambos.

La incompatibilidad se produce cuando hay una repulsión neta entre los dos biopolímeros, y se favorece la interacción biopolímero-solvente, en vez de biopolímero-biopolímero y solvente-solvente (de Jong & van de Velde, 2007).

Los geles de proteínas y polisacáridos puros forman estructuras características a cada uno de ellos, mientras que cuando se forman geles mixtos se producen cambios en la estructura del gel mediante distintos mecanismos según las concentraciones relativas de cada uno de ellos y las condiciones del medio (Turgeon, Beaulieu, Schmitt & Sánchez, 2003). Cuando los componentes del sistema mixto son gelificantes, los geles obtenidos pueden ser de tres tipos (Morris, 1986) (**Figura 1.5**):

1. Redes acopladas
2. Redes interpenetrantes
3. Redes de fases separadas

Las redes acopladas o redes de coacervado complejo se forman en presencia de interacciones intermoleculares favorables entre los diferentes tipos de polímeros (Picullel & Lindman, 1992, Tolstoguzov, 1991, 1995).

Las redes interpenetrantes se forman cuando las componentes de una mezcla gelifican separadamente y se forman dos redes independientes. Ambas redes son continuas a lo largo de la muestra pero cualquier interacción entre ellas es sólo topológica (Morris, 1986).

Las redes de fases separadas son las más usuales y se dan cuando hay incompatibilidad termodinámica, que sucede por el mecanismo explicado anteriormente. La separación de fases

compite con la gelificación, cuando la mezcla de proteínas globulares y polisacáridos se somete a tratamiento térmico. El sistema resultante es un gel que puede parecer homogéneo a nivel macroscópico pero es heterogéneo a nivel microscópico. Así, la microestructura final obtenida es un balance entre la separación de fases y el proceso de gelificación (de Jong, Klok & van de Velde, 2009).

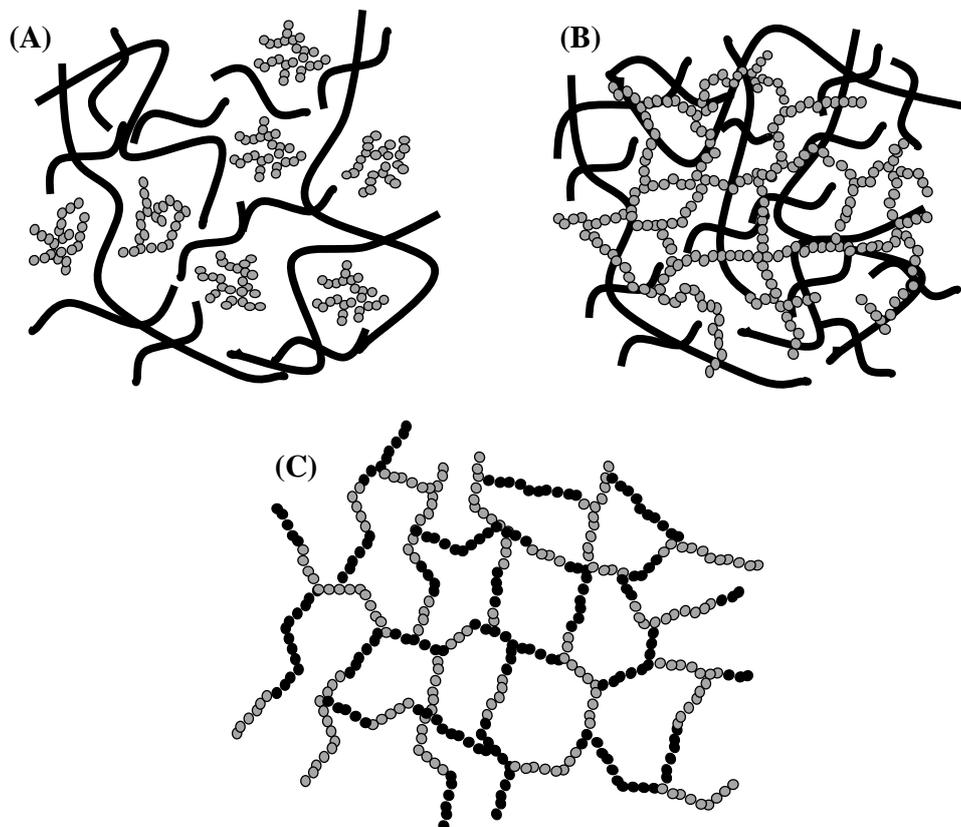


Figura 1.5. Redes de geles mixtos. (A) Redes interpenetrantes. (B) Red de fases separadas.

(C) Redes acopladas. Figura adaptada de Oakenfull et al. (1997).

1.2.3.1. Incompatibilidad termodinámica

Cuando uno o los dos polímeros no tienen carga, las contribuciones entrópicas pueden ser mayores que las entálpicas, y el resultado más común es la separación de fases segregativa

o incompatibilidad termodinámica de estos dos biopolímeros (Doublier et al., 2000; Morris & Wilde, 1997). Los polímeros se comportan muy diferentes a las pequeñas moléculas en solución, porque la entropía de mezclado (que favorece sistemas de una sola fase) es dependiente del número de moléculas presentes, más que de su concentración o peso (Oakenfull et al., 1997). Ya que los polímeros tienen alto peso molecular, sus soluciones contienen relativamente menos moléculas que una solución de un soluto de bajo peso molecular de la misma concentración (en peso). La entropía de mezclado se vuelve, por lo tanto, insignificante para polímeros y el comportamiento de sistemas de polímeros mixtos es decidido por la energía de interacción entre las cadenas (Oakenful et al., 1997).

La presencia y extensión de la separación está influenciada por una amplia gama de factores intrínsecos y extrínsecos, incluyendo la concentración de biopolímeros, el peso molecular, la conformación, la densidad de carga, y por lo tanto, el pH y la fuerza iónica del disolvente (Tolstoguzov, 1991). La naturaleza del polisacárido es el factor que más fuertemente afecta la separación de fases en sistemas proteína-polisacárido (Grinberg & Tolstoguzov, 1997), como ser peso molecular, carga, grado de ramificación, entre otros. La separación de fases ocurre por arriba de una concentración crítica de proteínas. A menores concentraciones, la proteína y el polisacárido coexisten en una sola fase conteniendo ambos biopolímeros en dominios independientes (uno excluye al otro) (Sánchez, Bartholomai & Pilosof, 1995; Tolstoguzov, 1997; Carp, Bartholomai, & Pilosof, 1999).

Para estos sistemas aunque un solo componente gelifique, la morfología del sistema biopolimérico mixto depende de las velocidades relativas de la separación de fases y la formación de gel (Alevisopoulos, Kasapis, & Abeysekera, 1996; Lorén & Hermansson, 2000).

Como consecuencia de la segregación de fases, se ve afectado en gran medida el comportamiento viscoelástico del sistema multicomponente, aún cuando la separación de

fases no puede ser observada por técnicas microscópicas (Fitzsimon et al., 2008). Las consecuencias de la segregación de los biopolímeros y la concentración “local” de cada componente en la mezcla afecta al comportamiento reológico de los geles y disminuye la concentración crítica para la gelificación de proteínas (Capron, Nicolai, & Durand, 1999; Ould Eleya & Turgeon, 2000). También se observa un aumento en el carácter sólido de los geles hasta una cierta concentración crítica de proteínas por encima de la cual empieza a disminuir (Fitzsimons et al., 2008).

La mayoría de los estudios de gelificación de mezclas de proteínas y polisacáridos se dan en condiciones de incompatibilidad termodinámica (Beaulieu et al., 2001; Turgeon & Beaulieu, 2001; Fitzsimons et al., 2008; Tavares, Monteiro, Moreno & Lopes da Silva, 2005; Monteiro, Tavares, Evtuguin, Moreno & Lopes da Silva, 2005; Tavares & Lopes da Silva, 2003; Spotti, Santiago, Rubiolo & Carrara, 2012).

Por ejemplo, Syrbe, Fernandes, Dannenberg, Bauer & Klostermeyer (1995) estudiaron las interacciones de proteínas de suero (WPI, β -lg y α -lc) con una amplia gama de polisacáridos (metilcelulosa, carboximetilcelulosa, dextrano, maltodextrina, pectina, goma Guar, k-carragenina, goma Xántica y arabinogalactano). El énfasis principal de la investigación fue la separación de fases en soluciones mixtas de proteínas y polisacáridos a altas concentraciones de ambos. La gelificación fue inducida por calor en las mezclas homogéneas de 12% de WPI con los polisacáridos seleccionados y fue seguida mediante el módulo elástico (G') por reología oscilatoria. El aumento en la firmeza de los geles fue atribuido a un aumento en la concentración efectiva de proteína en la fase continua, debido a la separación de fases que ocurrió durante el calentamiento, donde se obtuvo una red de proteínas continua con una fase rica en polisacáridos dispersa a través de ella. Sin embargo, algunos sistemas (goma Guar con proteínas de suero), aunque registraron aumentos en G' ,

permanecieron homogéneos incluso a valores de pH cercanos al punto isoeléctrico de la proteína.

1.3. Modificación de las propiedades funcionales de proteínas

Como ya se mencionó, gracias a sus propiedades funcionales, las proteínas son muy utilizadas como ingredientes en sistemas coloidales complejos como emulsiones, espumas y geles. Es por esto, que hay un creciente interés en la mejora y la modificación de estas propiedades para la producción de novedosas formulaciones de este tipo, no solo en el campo de la industria alimentaria, sino también en el de la farmacéutica y cosmética (Rodríguez Patino, Rodríguez Niño & Carrera Sánchez, 2002).

La modificación de las propiedades funcionales de las proteínas puede llevarse a cabo de forma química (Feeney, 1977), física o enzimática, a través de acidificación, hidrólisis, calentamiento, acetilación, entrecruzamiento enzimático, entre otros (Puski, 1975; Franzen & Kinsella, 1976; Cheftel, 1977; Feeney, 1977; Matarella, Creamer & Richardson, 1983; Matheis, Penner, Feeney & Withaker, 1983; Arce, Pilosof & Bartholomai, 1991; Lakkis & Villota, 1992; Nakamura, Kato & Kobayashi, 1991; Nagasawa, Takahashi & Hattori, 1996; Abtahi & Aminlari, 1997; Bernardi, Pilosof & Bartholomai, 1991). Estos tratamientos modifican la capacidad de formar geles, retención de agua, solubilidad y la capacidad espumante y emulsionante, etc. (Blecker, Paquot, Lamberti, Sensidone, Lognay & Deroanne, 1997; Einhorn-Stoll, Ulbrich., Sever & Kunzek, 2005).

La mayoría de las modificaciones químicas no han sido usadas para aplicaciones alimenticias por el peligro potencial para la salud, como la aparición de productos perjudiciales, alteraciones en su digestibilidad y/o alergenicidad (Matoba, Doi & Yonezawa, 1980; Kato, 2002). En algunos casos la aplicación de estos métodos requiere el uso de reactivos tóxicos, lo que también limita su uso como ingrediente alimenticio a posteriori

(Hattori, Aiba, Nagasawa & Takahashi, 1996; Nagasawa, Ohgata, Takahashi & Hattori, 1996).

Como ya se discutió anteriormente, un método para modificar las propiedades funcionales de las proteínas es mediante la interacción con polisacáridos (Baeza & Pilosof, 2001, Baeza et al., 2003; Jiménez-Castaño, Villamiel & Lopez-Fandiño, 2007). Las interacciones proteína-polisacárido puede ser a través de enlaces no covalentes (puentes hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, etc.) o covalentes. Los enlaces covalentes más comunes son los puentes disulfuro entre residuos de cisteína (Oakenfull et al. 1997), aunque también pueden introducirse enlaces covalentes entre proteínas y azúcares ó polisacáridos a través de la reacción de Maillard.

1.4. La Reacción de Maillard

La unión entre grupos amino y carbonilos a través de la reacción de pardeamiento no enzimática, ó de glicosilación conocida comúnmente como reacción de Maillard, ha sido muy estudiada principalmente desde un punto de vista nutricional, toxicológico y sensorial debido al desarrollo de aromas, sabores y olores que aparecen como consecuencia del procesado de los alimentos (Goloberg, Weijng & Melpomeni, 2004; Miller & Gerrard, 2005).

Fue descubierta por el químico francés Louis Maillard en 1912, estudiando la pérdida de lisina (aminoácido esencial), en los alimentos conservados cuando éstos son ricos en proteínas y glúcidos. En la actualidad es considerada de importancia en la industria alimentaria, ya que el impacto de esta reacción sobre las propiedades funcionales de las proteínas influyen sobre el carácter sensorial del alimento (Mulsow, Jacob & Henle, 2009) y en muchos casos determinan la textura y vida útil de productos alimenticios (Manzocco & Maltini, 1999).

Los mecanismos por los cuales se lleva a cabo esta reacción son complejos. En la **Figura 1.6**, se observa un esquema de los pasos de la reacción.

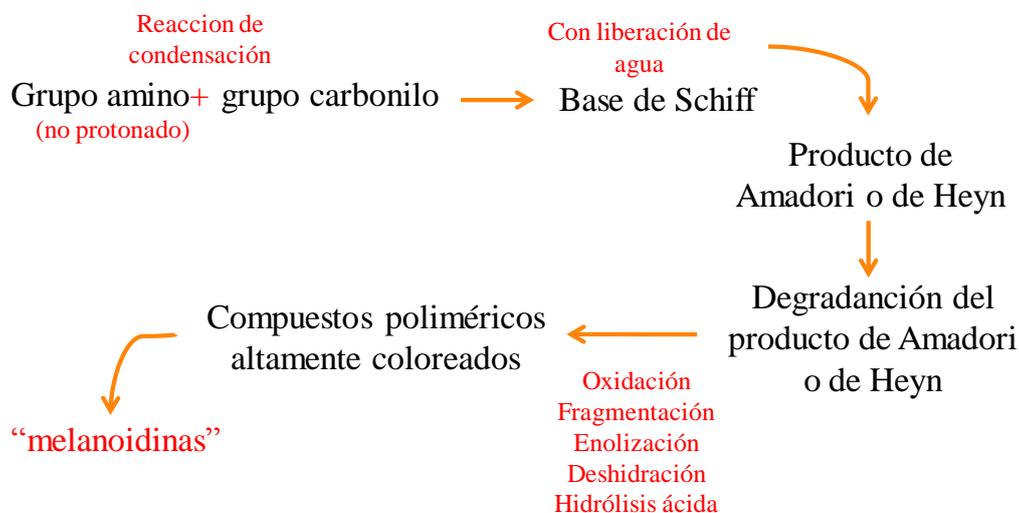


Figura 1.6. Esquema de los pasos de la reacción de Maillard.

En una primera instancia se produce la condensación de un grupo amino no protonado de la proteína con un grupo carbonilo de un azúcar reductor para formar una base de Schiff. Badui (1999), señala como azúcares reductores, los que presentan un grupo carbonilo (grupo funcional) intacto, el cual puede reaccionar con otras especies. Los azúcares reductores que favorecen la reacción de Maillard son en primer término las pentosas, y en segundo lugar, las hexosas; además las aldosas actuarán más fácilmente que las cetosas, y los monosacáridos son considerados más efectivos que los disacáridos en términos de ésta reacción.

A continuación se forma cetosamina o aldosa (Figuras 1.7 y 1.8), según de qué compuesto se partió (si era una cetosa o aldosa), la cual es más estable y se la conoce como producto de Amadori o de Heyns (Miller & Gerrard, 2005). Los diversos pasos que suceden a continuación en la reacción, dependerán de los isómeros de estos compuestos.

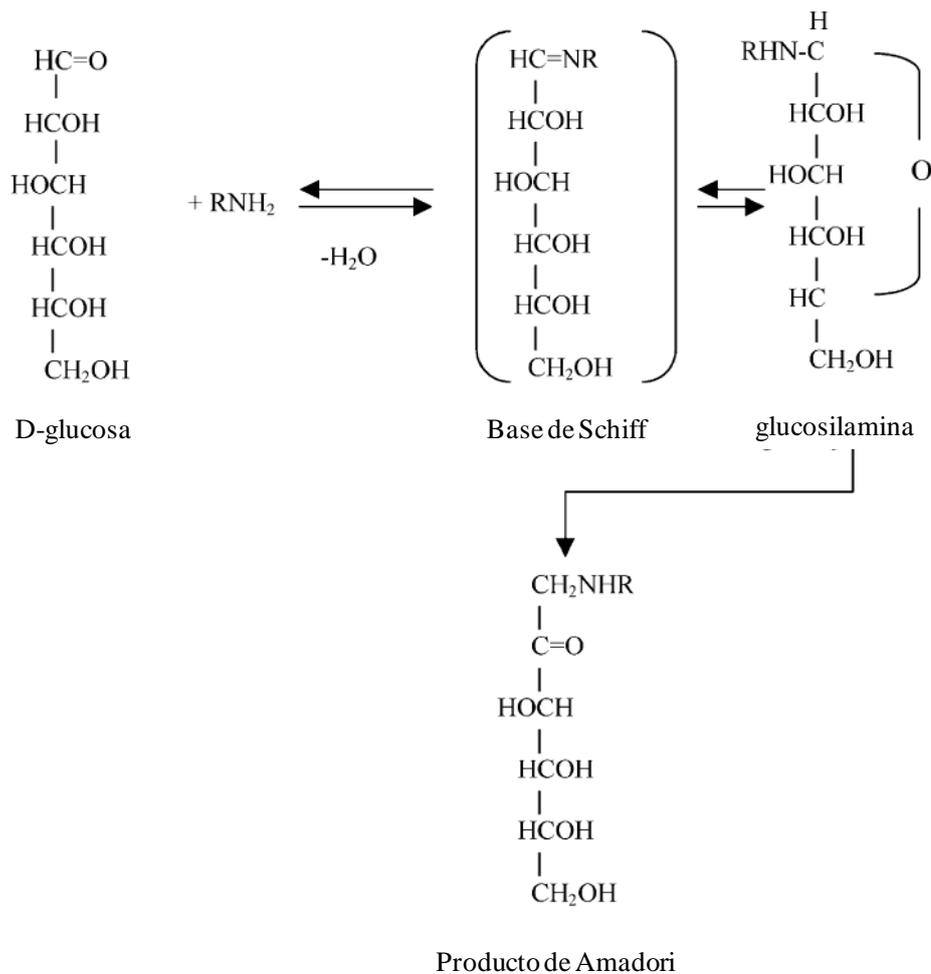


Figura 1.7. Inicio de la reacción de Maillard partiendo de D-glucosa. (Adaptado de Oliver et al., 2006)

Luego de la obtención de los productos de Amadori o de Heyns, tres caminos diferentes se han identificado: reacciones de deshidratación y escisión de productos hidrolíticos de cadena corta, por ejemplo diácetilos y pirivaldehído, “degradaciones de Strecker” con amino ácidos, o condensación a aldoles (Badui, 1999).

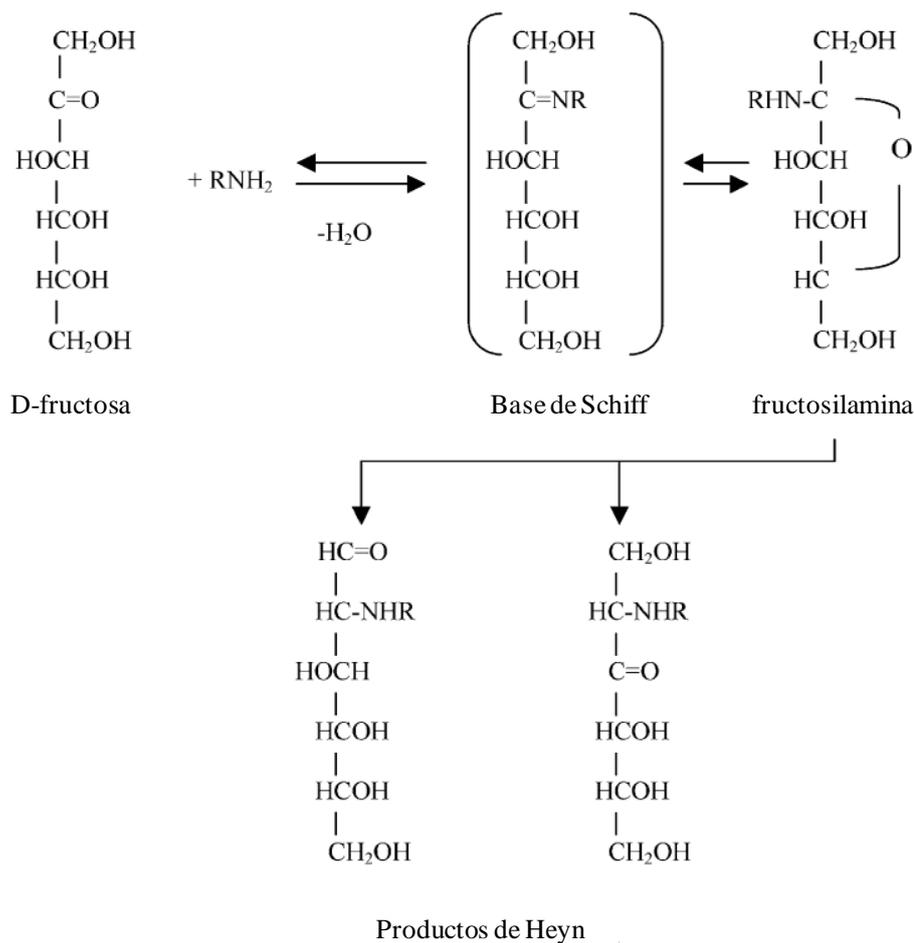


Figura 1.8. Inicio de la reacción de Maillard partiendo de D-fructosa. (Adaptado de Oliver et al., 2006).

La reacción favorece la formación de cientos de productos debido a reacciones consecutivas y paralelas incluyendo polimerizaciones, oxidaciones, reducciones y condensaciones aldólicas, ciclizaciones, enolizaciones, entre otras., para formar una gran variedad de compuestos, entre ellos derivados furanos, nitrogenados, heterocíclicos, entre otros, y en las etapas más avanzadas de la reacción también podemos encontrar compuestos poliméricos altamente coloreados que contienen nitrógeno y que son principalmente

insolubles llamados melanoidinas (Cheftel, Cuq & Lorrient, 1989; Ordoñez Pereda, Cambero Rodriguez, Fernandez Alvarez, García de Fernando Miguillón, Hoz Perales & Selgas Certero, 1998).

El conocimiento y entendimiento de las propiedades estructurales, funcionales y fisiológicas del grupo de componentes de la reacción de Maillard presentes en los alimentos es limitado. Se considera una reacción complicada porque produce un amplio número de productos denominados “Productos de Reacción de Maillard” (PRM) (Wijewickreme & Kitts, 1997). La amplia variedad de productos formados ha forzado a clasificarlos como productos en diferentes etapas: tempranas, avanzadas y finales (Yaylayan & Huyghues-Despointes, 1994).

Los factores que influyen la reacción son la concentración de los reactivos, tipo de aminoácidos e hidratos de carbono (azúcares, oligosacáridos o polisacáridos), temperatura, presencia de oxígeno, tiempo, pH inicial, actividad de agua, entre otros (Kim & Lee, 2009).

El tipo de aminoácido es un factor importante. El aminoácido lisina, con dos grupos aminos, reaccionará con rapidez produciendo colores oscuros en la reacción, mientras que la cisteína con grupos sulfuros, causará olores específicos, y menos color en los productos (Badui, 1999).

El peso molecular del hidrato de carbono presente en la reacción influye en la velocidad de reacción, lo cual hará que la reacción con el amino ácido se lleve a cabo lenta o rápidamente, según sea el caso. El azúcar del tipo pentosa (5 átomos de carbono), como la ribosa, reaccionará más rápido que los azúcares hexosa (glucosa, fructosa) y disacáridos (sacarosa, lactosa). La estructura del hidrato de carbono también es importante, las aldosas (galactosa) son consideradas más reactivas que las cetosas (como fructosa), concluyendo que esto es debido a la presencia de la cantidad grupos carbonilos electrofílicos.

Los polisacáridos tienen un grupo carboxilo reductor que puede interactuar con los grupos amino, por ejemplo de los aminoácidos de las proteínas. En la **Figura 1.9** se puede observar un esquema cuando esta reacción ocurre entre una proteína y un polisacárido.

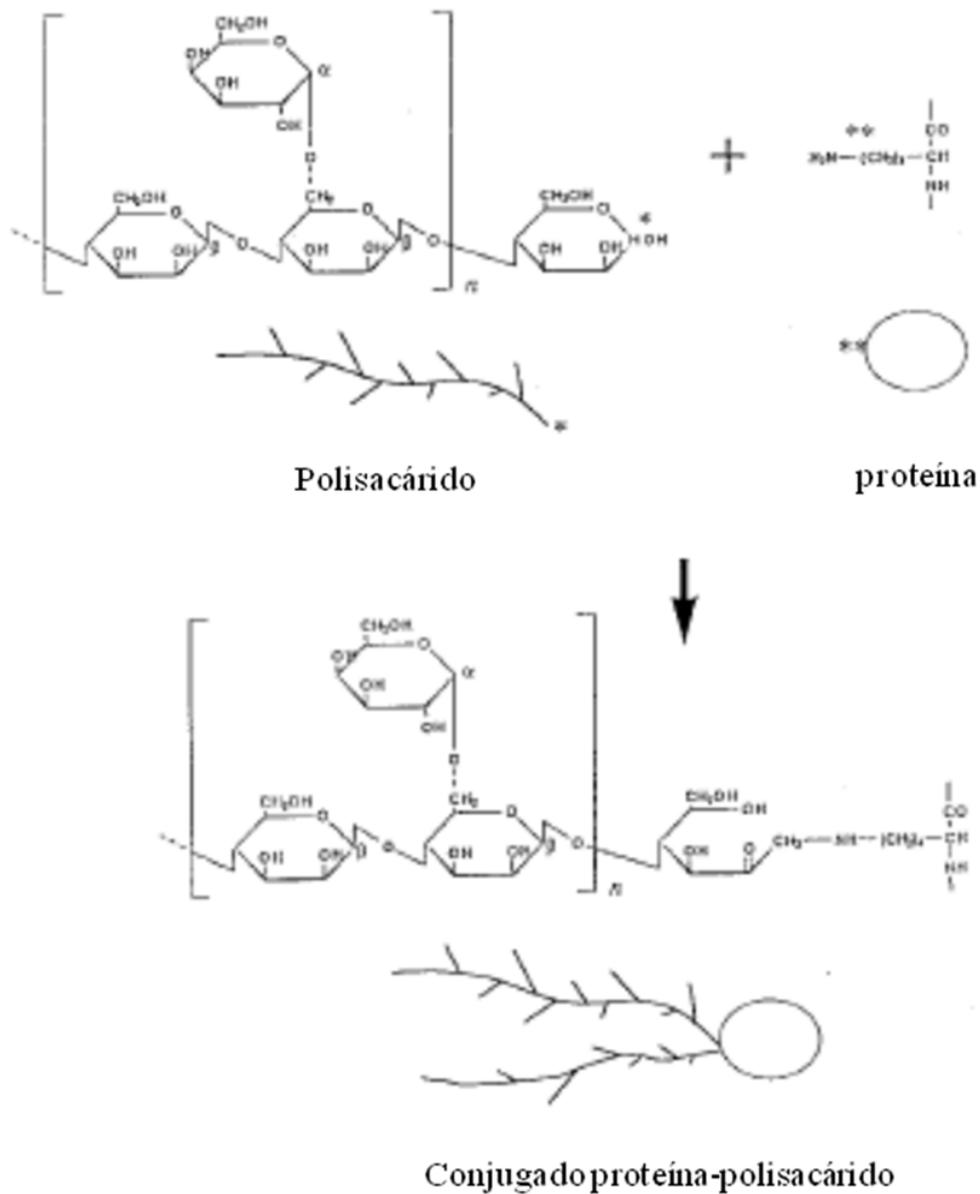


Figura 1.9. Esquema de la reacción de Maillard entre una proteína y un polisacárido.

Kato, Shimokawa & Kobayashi (1993) indican que son numerosos los estudios enfocados en evaluar la funcionalidad de los glicoconjugados de Maillard, tanto desde el punto de vista beneficioso como de resultados perjudiciales.

Algunos de los efectos beneficiosos han sido asociados con los estados avanzados de la reacción de Maillard, los cuales producen compuestos con capacidad antioxidante (Chevalier et al., 2000; Murakami et al., 2002; Babiker, 2002; Wagner, Derkits, Herr, Schuh & Elmadfa, 2002; Rizzi, 2003). Chen, Yang, Chen & Liu (2009), señalan que de acuerdo a la tendencia observada en la formación del compuesto hidroximetilfurfural (HMF) y al incremento de la actividad antioxidante, se podría especular que el compuesto HMF podría contribuir a la actividad antioxidante presentada por los PRM. También se evidenció comportamiento bacteriostático y bactericida (Kato, 2002) de algunos PRM.

Por otra parte, la reacción de Maillard puede reducir el valor nutricional de un alimento, por las pérdidas o disminución de la cantidad de aminoácidos disponibles debido al bloqueo de la lisina y/o de otros aminoácidos esenciales (Murakami et al., 2002).

Algunos años atrás se comenzó a estudiar la utilización de esta reacción en la síntesis controlada de derivados conjugados de proteínas y polisacáridos para generar nuevos compuestos con propiedades funcionales mejoradas.

1.4.1. Influencia de los productos de la reacción de Maillard sobre las propiedades funcionales de proteínas

Los PRM posibilitan alterar las propiedades físico-químicas de los compuestos de partida y crear nuevas funcionalidades. Comparado con moléculas de carbohidratos pequeñas, la baja reactividad de los polisacáridos y el impedimento estérico generado por las moléculas unidas limitan la extensión de la reacción de Maillard y disminuye las reacciones subsecuentes, inhibiendo el desarrollo de color excesivo y la polimerización de las proteínas

(Kato, 2002). Sin embargo, las propiedades funcionales finales de las proteínas conjugadas obtenidas vía reacción de Maillard dependen tanto de las propiedades de la proteína, como ser hidrofobicidad y viscosidad, como de las características del polisacárido (Kato, Sasaki, Furuta & Kobayashi, 1990), como ser peso molecular, carga, longitud de las cadenas y su ramificación (Jimenez-Castaño et al., 2007, Dunlap & Côté, 2005).

En las primeras etapas de la reacción de Maillard se pudo demostrar que los conjugados tuvieron mejores propiedades emulsionantes que las proteínas precursoras (Dickinson & Galazka, 1991; Kato, Mifuru, Matsudomi & Kobayashi, 1992; Groubet, Chobert & Haertlé, 1999; Darewicz & Dziuba, 2001; Kato, 2002; Diftis & Kiosseoglou, 2003; Einhorn-Stoll, Ulbrich, Sever & Kunzek, 2005; Oliver, Melton & Stanley, 2006), así como mejores propiedades espumantes (Dickinson & Izgi, 1996), mayor solubilidad proteica (Katayama, Shima & Saeki, 2002; Saeki & Inoue, 1997; Sato, Sawabe, Kishimura, Hayashi & Saeki, 2000; Shepherd, Robertson & Ofman, 2000) y mayor estabilidad al calor (Chevalier, Chobert, Genot & Haertlé, 2001; Hattori, Ogino, Nakai & Takahashi, 1997). También se ha demostrado que los conjugados tempranos de la reacción de Maillard de ciertas proteínas con la lisozima tienen mejor actividad antimicrobiana o bactericida (Nakamura, Ogawa, Nakai, Kato & Kitts, 1998; Song, Babiker, Usui, Saito & Kato, 2002; Takahashi, Lou, Ishii & Hattori, 2000).

En general presentan mayor estabilidad térmica y solubilidad (Kato et al., 1990). Por ejemplo, Broersen, Elshof, de Groot, Voragen., Hamer, & de Jongh (2007) estudiaron el sistema β -lg/glucosa y encontraron que se inhibe o retarda la desnaturalización y se favorece la agregación en los sistemas conjugados por Maillard. Matsudomi, Nakano, Soma, & Ochi (2002) encontraron que derivados de albúmina de huevo/galactomanos presentaban mayor solubilidad con respecto a la proteína sola (los conjugados se mantenían solubles si eran

calentados a 90°C, mientras que el 90% de la proteína en forma individual precipitaba a 80°C).

La aplicación de estos derivados está orientada a alimentos y otros campos, ya que la reacción en general no requiere catalizador y bajo condiciones bien controladas es posible llegar a los productos deseados de la reacción de Maillard (Oliver et al., 2006).

1.5. Polisacáridos

Los polisacáridos también son muy utilizados en la industria alimentaria, además de sus propiedades nutricionales, actúan como espesantes, enlazantes, y agentes estabilizantes en los sistemas alimentarios.

Son clasificados de acuerdo a la cantidad de carbonos presentes o por el grupo funcional que ésta adherido, pueden sufrir reacciones de esterificación, aminación, reducción, u oxidación, lo que le otorga a cada estructura una propiedad específica.

La estructura química de los polisacáridos puede ser tan diversa como su origen, pero en general tienen gran número de hidroxilos altamente hidrófilos, los cuales poseen la capacidad de hidratarse y formar puentes de hidrogeno. Ellos pueden aportar dulzor, capacidad espesante y/o de gelificación, pueden generar reacciones de oscurecimiento y de fermentación, inhibiendo el crecimiento microbiano, confiriendo viscosidad y textura a los alimentos (tales como son la inversión de la sacarosa, cuya cristalización influye en la textura), higroscopicidad, solubilidad, estado amorfo, estados vítreos (Bohinski, 1978).

En el desarrollo de la presente tesis se utilizaron dextranos. Estos son polisacáridos compuestos principalmente por una cadena lineal de residuos de glucosa unidos por enlaces α -(1,6), con algunas ramificaciones α -(1-3) (**Figura 1.10**).

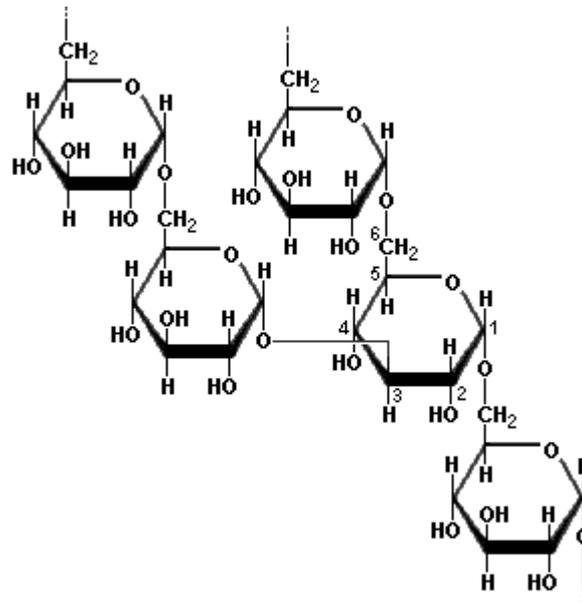


Figura 1.10. Los dextranos están compuestos por cadenas lineales de residuos de D-glucosa unidos por enlaces α (1-6), con algunas ramificaciones en posición α (1-3). Imagen extraída de <http://www.scientificpsychic.com>

Los dextranos son estructuralmente diversos y se caracterizan de acuerdo con el porcentaje, naturaleza y distribución de sus enlaces. El dextrano se produce generalmente en cultivos de bacterias como *Leuconostoc spp.*, en medios que contienen sacarosa. Las células en crecimiento secretan una enzima inducible que convierte el exceso de sacarosa en dextrano, liberando fructosa al medio (Salou, Loubiere, & Pareilleux, 1994). Fueron aislados por primera vez en 1906 por Scheiber, y su principal aplicación radicó en el área farmacéutica como expansor del volumen del plasma sanguíneo y promotor del flujo de sangre, aglutinante y lubricante (Belder, 2003). Actualmente se pueden conseguir del peso molecular que se desee, desde 5-10 kDa hasta 150.000 kDa.

Son muy usados para conjugar proteínas, ya que son de naturaleza reductora y al ser neutros se inhibe la formación de complejos electrostáticos. La estructura de los dextranos es muy flexible cuando están en solución acuosa. Ellos son incapaces de formar estructuras tipo

gel, lo que es apto para estudios de gelificación de proteínas (Sun, Yu, Yang, Wang, Zhang, Zhang & Zheng, 2011).

1.6. Técnicas utilizadas durante el desarrollo de la tesis.

1.6.1 Técnicas para determinar el avance de la reacción de Maillard.

El desarrollo de la reacción de Maillard se puede determinar en las etapas iniciales, intermedias y avanzadas.

A) Etapas iniciales: en las etapas iniciales de la reacción de Maillard no se observa color pero sí aumenta el poder reductor y se puede monitorear la desaparición de los reactivos (azúcar reductor o aminoácidos), o la formación de los productos de Amadori. Una técnica muy útil para determinar la disminución de grupos aminos libres que no han reaccionado en las proteínas es mediante la técnica del o-ftaldialdehído (OPA). También se han aplicado otras metodologías para la detección de estos compuestos como análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), entre otros (Yaylayan & Huyghues-Despointes, 1994, Ge & Lee, 1996; Blanka, Davidekb, Devauda & Cletyby, 2002).

B) Etapas intermedias: se consideran intermediarios aquellos compuestos que se forman durante la descomposición de azúcares y no son coloreados, pero que se pueden polimerizar fácilmente para dar macromoléculas de color marrón. Generalmente los compuestos intermediarios se determinan por medición de densidad óptica en el rango ultravioleta (UV), ya que en esta fase aparece un color amarillento y aumenta la absorción UV cercana debido a la deshidratación de los azúcares y formación de compuestos α -carbonílicos. Se puede medir también el desarrollo de compuestos volátiles mediante cromatografía gaseosa (Matiacevich, 2008) y de fluorescencia (Farroni & Buera, 2012). El

desarrollo de fluorescencia durante la reacción de Maillard fue ampliamente comprobado en numerosos sistemas azúcar-amino (Burton, Mc Weeny, Panhi & Biltcliffe, 1962; Adhikari, 1973; Leclère & Birlouez-Aragon, 2001), verificándose además que este desarrollo es mucho mayor en un sistema que contenga únicamente azúcar. Solamente se han determinado algunos de los compuestos fluorescentes que se generan. La disminución del pH, que ocurre por bloqueo de los grupos amino y por la generación de los compuestos acídicos, también es otro posible indicador.

C) Etapas finales: en las etapas finales se observa la aparición de pigmentos de color pardo-rojizo intenso. Los pigmentos generados tienen absorbancia en el espectro visible. La variable más frecuentemente empleada para medir el desarrollo de la reacción de Maillard en alimentos o sistemas modelo es la densidad óptica del sistema pardeado a una longitud de onda particular (generalmente entre 390-500 nm) (Ellis, 1959; Lee, Sherr & Koh, 1984). En presencia de proteínas los productos de glicosilación desarrollan un hombro de absorción a los 300 nm y fluorescencia azul a los 460 nm (excitando a 370 nm).

1.6.2. Fluorescencia del triptófano. Relación con los cambios conformacionales de las proteínas.

La fluorescencia intrínseca de las proteínas está originada por aminoácidos aromáticos, como el triptófano (Trp), la tirosina, y la fenilalanina. Las propiedades de fluorescencia de los residuos intrínsecos en las proteínas cambian al producirse la desnaturalización de las proteínas ya que el máximo de emisión de las proteínas refleja el promedio de los residuos Trp expuestos a la fase acuosa (Matiacevich, 2008; Lakowicz, 1999). Dado que la emisión de fluorescencia del Trp es altamente sensible al ambiente local, esto es frecuentemente utilizado como indicador para conocer si se produjeron cambios conformacionales en las proteínas.

La energía promedio de emisión de los residuos de Trp usualmente cambia hacia el rojo debido a la exposición al solvente. En el estado desnaturalizado de las proteínas, los residuos de trp tienen un espectro en agua con un máximo a 355nm, en vez de 340 nm que tienen en su estado nativo (Royer, 1995).

En la β -lg (que es la principal proteína del suero) hay dos residuos Trp presentes en la proteína, los cuales le confieren propiedades fluorescentes a la misma. Uno de ellos se ubica en la posición 19 y el otro en la posición 61 de la secuencia primaria. Según Papiz et al. (1986) el Trp 19 estaría localizado en el interior hidrofóbico de la proteína, mientras que el Trp 61 se encontraría adyacente a un residuo de lisina en la posición 62, próximo al puente disulfuro establecido entre Cys 160-Cys 66, muy cerca de la superficie proteica. Sin embargo, se ha sugerido que la intensidad de fluorescencia del Trp 61 se vería considerablemente disminuida por un proceso de quenching (o apagamiento) ejercido por el puente disulfuro cercano (Bhattacharjee & Das, 2000). Por lo tanto, la fluorescencia intrínseca de la proteína estaría gobernada principalmente por el residuo Trp 19, mientras que el Trp 61 contribuiría sólo en menor medida.

1.6.3. Determinación de propiedades reológicas de los geles

La reología es la ciencia de deformación y flujo de los materiales (Steffe, 1992). Un gel es un material semisólido, tiene rigidez, pero rápidamente se deforma bajo un esfuerzo aplicado. Cuando aplicamos una fuerza a un sólido elástico, la forma cambia (por ejemplo, si estiramos una banda elástica) y la deformación es proporcional al esfuerzo aplicado. Cuando se remueve esta fuerza, vuelve a su forma original y la mayoría de la fuerza usada para su deformación es recuperada. Por el contrario, cuando aplicamos la fuerza a un líquido, éste responde fluyendo, y la velocidad del flujo es proporcional a la fuerza aplicada. Un gel es viscoelástico, tiene propiedades reológicas tanto de líquido como de sólido. Este es el

comportamiento reológico específico, que es la característica principal del estado de gel (Stading & Hermansson, 1990; Oakenfull, et al., 1997).

Hay dos clases amplias de medidas reológicas: aquellas hechas con pequeñas deformaciones y las hechas con grandes deformaciones (Stading & Hermansson, 1991). Una suave presión deforma la superficie del gel, pero si se presiona más, el gel se fractura (**Figura 1.11**). Estas son las pequeñas y grandes deformaciones, respectivamente. Esta es una importante distinción, porque ellas proveen clases de información muy diferentes acerca de la naturaleza de los geles.

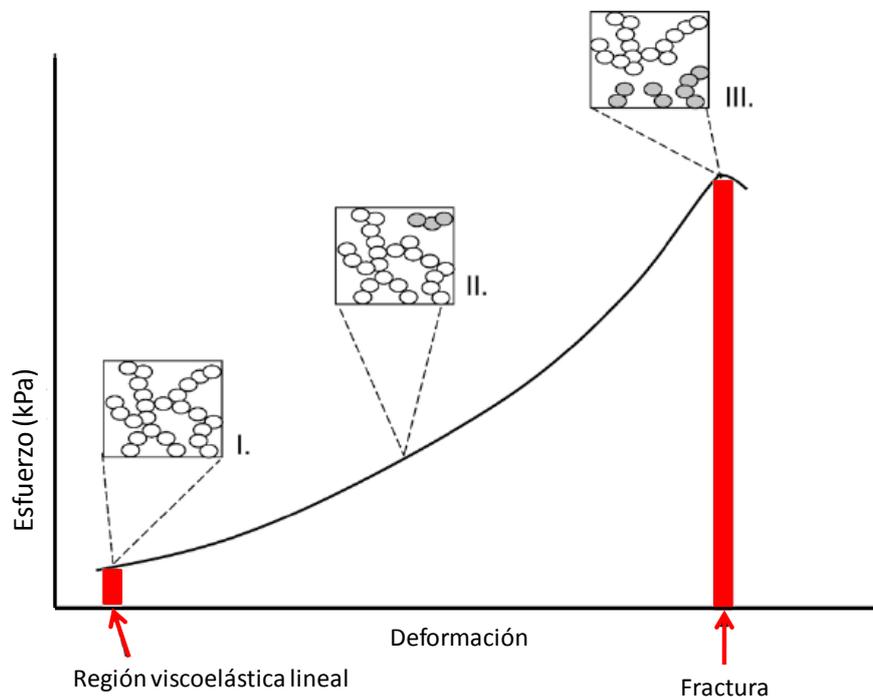


Figura 1.11. Gráfico hipotético del comportamiento de un gel biopolimérico durante la aplicación de un esfuerzo. Las barras rojas indican las condiciones límites de viscoelasticidad lineal y fractura. La parte I indica estructura intacta, la parte II pequeñas grietas y la parte III la fractura. Las esferas grises indican que esas moléculas se separaron del resto de la red. Adaptada de Foegeding (2007).

Al contrario de lo que ocurre con las medidas de grandes deformaciones, la teoría de las pequeñas deformaciones es mucho más avanzada y las medidas correspondientes son más informativas. Antes, las medidas de pequeñas deformaciones eran muy difíciles de llevarlas a cabo, pero ahora gracias a la informática todo se ha vuelto más sencillo. Los reómetros oscilatorios son los equipos donde se realizan este tipo de ensayo, como el ilustrado en la **Figura 1.12**.



Figura 1.12. Reómetro oscilatorio con platos paralelos.

Como los geles son viscoelásticos, un gel toma un tiempo finito para responder a un esfuerzo aplicado y se puede obtener más información a partir de medidas dinámicas que de medidas de deformación estáticas (Oakenfull et al., 1997). En las medidas dinámicas, las

muestras son sujetas a oscilaciones. Típicamente, se aplica un esfuerzo sinusoidal a la muestra, lo que causa que se transmita un esfuerzo por el material.

La magnitud y el tiempo de respuesta de la transmisión dependen de la naturaleza viscoelástica de la sustancia. En materiales viscosos, se disipa mucho el esfuerzo por pérdidas por fricción y el tiempo de respuesta es largo, mientras que en materiales elásticos se transmite casi todo el esfuerzo y el tiempo de respuesta es corto (Steffe, 1992).

Un esfuerzo o deformación oscilante es ilustrada en la **Figura 1.13**. Cuando el material es un sólido elástico ideal está en fase con la deformación, cuando es un líquido ideal hay una diferencia de fase de 90° , y cuando el material es un gel viscoelástico el ángulo de fase está entre esos dos extremos (Steffe, 1992).

El resultado de tales medidas es expresado con dos parámetros. Por un lado, el módulo de almacenamiento G' (o módulo elástico):

G' = componente del esfuerzo en fase con la deformación

Y por el otro, el módulo de pérdida G'' (o módulo viscoso), que se define como:

G'' = componente del esfuerzo a 90° fuera de fase con la deformación

El módulo de almacenamiento G' , caracteriza la rigidez de la muestra (la energía gastada en deformar un sólido elástico es almacenada y recuperada cuando el esfuerzo es liberado), mientras que el módulo de pérdida G'' , caracteriza la resistencia de la muestra al flujo (la energía gastada en inducir el flujo es disipada como calor y por lo tanto, perdida).

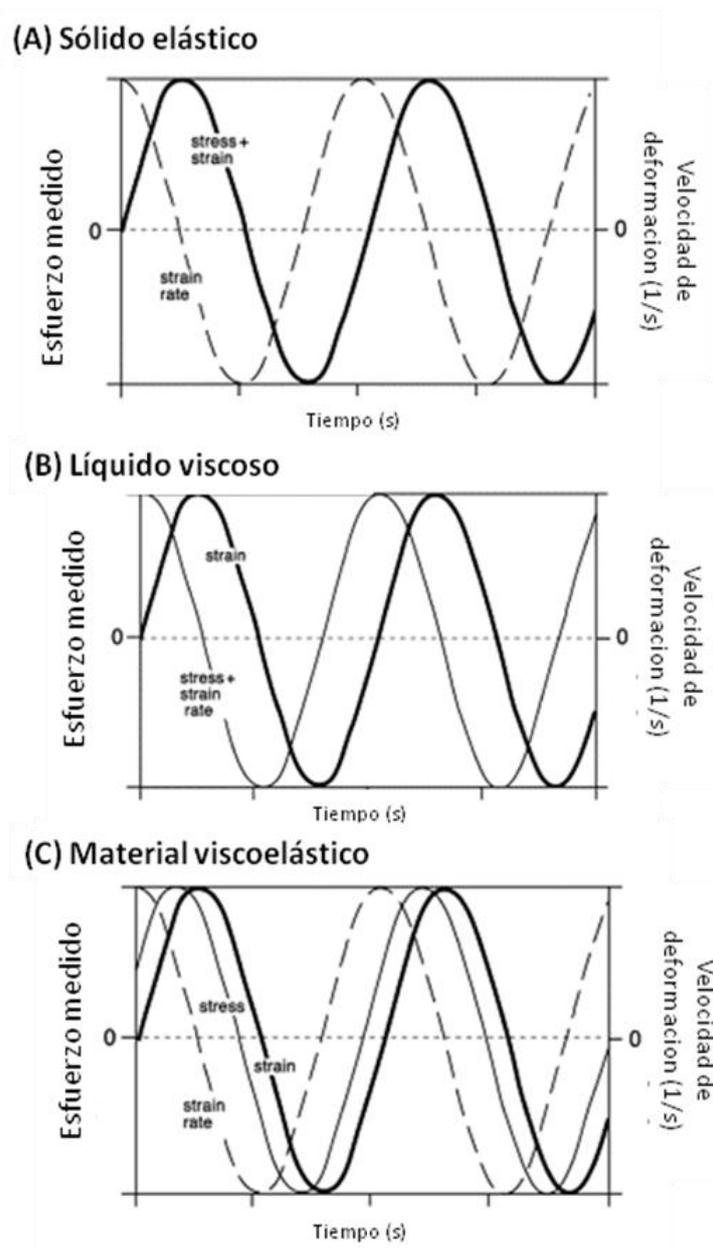


Figura 1.13. Respuesta de diferentes materiales al esfuerzo oscilante sinusoidal.

Otra magnitud cuantificada es el ángulo de pérdida que está dado por:

$$\tan \delta = G''/G'$$

Así, la $\tan \delta$ es una medida de la proporción de la energía perdida a la energía almacenada en una deformación cíclica. Un incremento en la $\tan \delta$ indica que el material se encuentra respondiendo a la tensión externa en un modo más viscoso y menos elástico.

Cuando $\tan \delta < 1$, el material es más sólido y cuando $\tan \delta > 1$, el material es más líquido. Cuando $G' = G''$, $\tan \delta = 1$ y el valor del módulo en este punto se conoce como módulo de cruce. En efecto, cuando el material es igualmente líquido como sólido.

En la **Figura 1.14** se puede observar un reograma de una solución proteica cuando se le aplica una rampa de calentamiento. En la Figura se puede observar a evolución de G' , G'' y $\tan \delta$ con el tiempo y la temperatura, mientras que la frecuencia y la deformación aplicada se mantienen constantes. Con este tipo de ensayo se puede determinar el punto de gelificación de sistemas de proteínas globulares, que es el correspondiente al punto donde G' y G'' se cruzan.

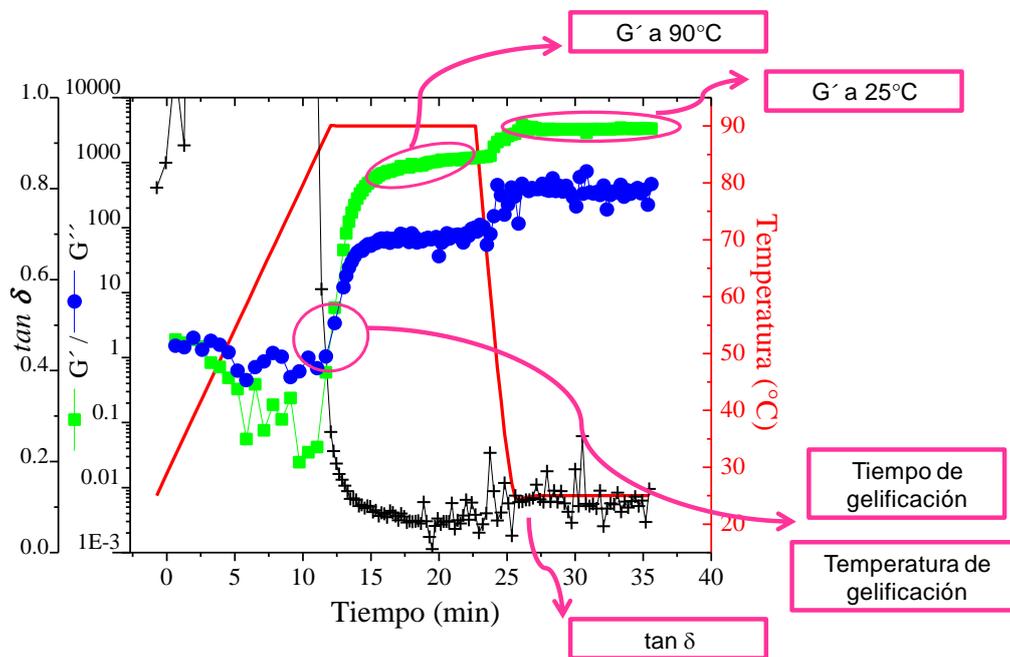


Figura 1.14. Evolución de G'' , G' y Temperatura en función del tiempo de una solución de WPI al 12% p/p.

Un ensayo comúnmente utilizado en reología oscilatoria para caracterizar estructuras gelificadas es la dependencia de G' y G'' con la frecuencia aplicada, lo que se denomina espectro mecánico. Un ejemplo de este tipo de espectro es mostrado en la **Figura 1.15**. Para un gel, un típico espectro mecánico en un rango de 10^{-2} a 10^2 rad s^{-1} , consiste de dos líneas

casi horizontales. G' es normalmente uno o dos órdenes de magnitud mayor que G'' , y ambos pueden mostrar un leve incremento a mayores frecuencias. El espectro mecánico así provee una útil definición reológica de gel: “un gel es un material viscoelástico para lo cual G' es más grande que G'' y por lo cual ambas G' y G'' son casi independientes de la frecuencia” (Stading & Hermansson, 1990).

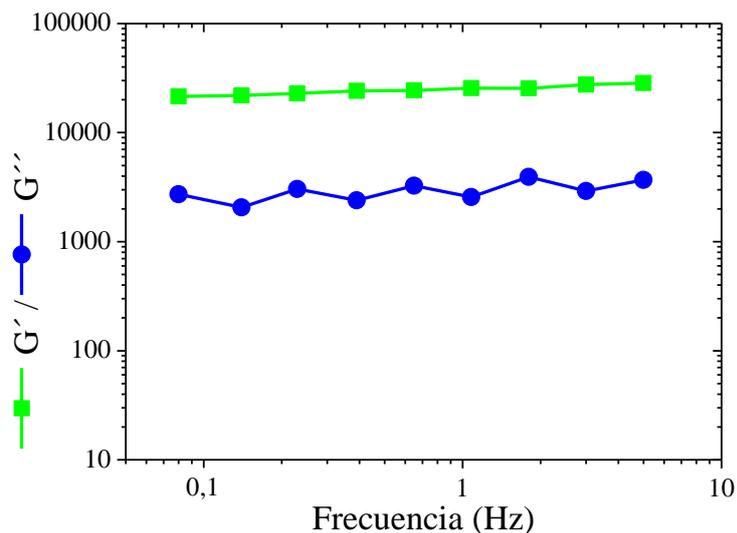


Figura 1.15. Espectro mecánico de un gel verdadero.

Las propiedades mecánicas de materiales sólidos y viscoelásticos (como los gels), materiales biológicos y alimentos incluidos, pueden describirse por algunos de los siguientes términos: Dureza, Fuerza, Deformabilidad, Fragilidad, Ductilidad, Rigidez, Elasticidad, Plasticidad, entre otras. Estas propiedades mecánico-estructurales están relacionadas con la palabra textura, que las personas percibimos como característica distintiva física de un alimento. Estas son “propiedades macroscópicas”, y son una manifestación general de las características estructurales y microestructurales, así como la expresión de las interacciones moleculares. Se han desarrollado instrumentos y métodos objetivos para cuantificar las

propiedades mecánicas y texturales de materiales viscoelásticos. La mayoría de estos ensayos son medidas de grandes deformaciones. Las medidas de grandes deformaciones son relativamente fáciles de hacer con simple equipamiento. El instrumento más común para este tipo de ensayos es un texturómetro o una máquina universal de ensayos (**Figura 1.16**). Típicamente, una muestra del gel es sometida a una fuerza a velocidad constante (Oakenfull et al., 1997).



Figura 1.16. Máquina universal de ensayos Instron.

Desafortunadamente, este tipo de medida está sujeta a mucho error aleatorio. Ambos valores, esfuerzo y deformación a la ruptura dependen de la velocidad a la cual se aplica la fuerza. Además, los eventos moleculares que preceden el corte son inherentemente al azar (Foegeding, 2010). Incluso en los experimentos replicados cuidadosamente habrá una distribución de valores. Sin embargo, las grandes deformaciones han probado ser más

fuertemente correlacionadas con la microestructura que los ensayos de pequeñas deformaciones (Baeza & Pilosof, 2001).

En la teoría clásica de fractura de materiales elásticos lineales, la falla está relacionada a la concentración de energía almacenada elásticamente en la punta de la grieta macroscópica (Mc Evoy, Ross-Murphy & Clark, 1985). En materiales elásticos, se dice que la ruptura ocurre porque hay una distribución de longitudes de cadenas de la red con tensiones de aplastamiento. Cada una de esas cadenas tiene un límite para extenderse, el cual puede ser estirado, y como se excede el valor para las cadenas más cortas, el esfuerzo extra es concentrado en ellas. Así, el material se fractura por una serie de eventos muy rápidos y al azar. Las cadenas de la red en un gel de proteínas tienen una capacidad muy limitada de aceptar la deformación molecular, por lo que la fractura ocurre a deformaciones mucho menores que las encontradas para materiales como gomas sintéticas (Oakenfull et al., 1997).

La distribución de los tamaños de poro dentro del gel puede tener un impacto mucho mayor sobre las propiedades de fractura. Las grietas se pueden propagar más fácilmente a través de las áreas de menor concentración de proteínas.

Algunos de los parámetros obtenidos de un típico ensayo de compresión uniaxial se ilustran en la **Figura 1.17**, donde se puede ver la relación entre el esfuerzo y la deformación para una muestra de gel bajo compresión. La pendiente de la parte inicial de la curva (región viscoelástica lineal), que corresponde a una pequeña deformación de la muestra (menor al 5% con respecto a la altura inicial del gel), es el módulo de Young ($E = \text{Esfuerzo/Deformación}$). El pico de fuerza antes de que el gel se quiebre es el máximo esfuerzo a la fractura.

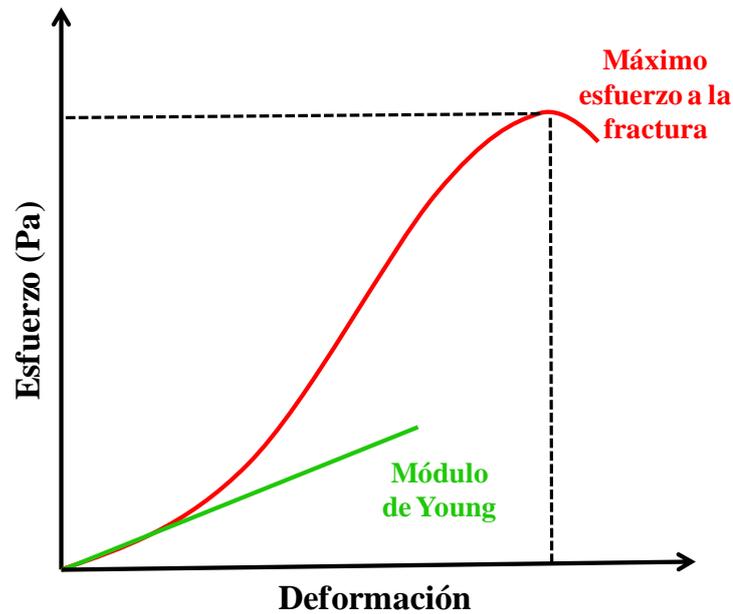


Figura 1.17. Las relaciones entre esfuerzo y deformación en un gel típico bajo compresión.

La microestructura controla la textura de un alimento, y está relacionada con la percepción del mismo originada en la estructura del producto y como este se comporta cuando es manipulado o comido (Rosenthal, 2001). Las propiedades macroscópicas son el reflejo de la microestructura de los geles (Montejano, Hamann & Lanier, 1985; van Vliet, 1995; Tromp, van de Velde, van Riel & Paques, 2001) es por esto que conociendo el proceso de gelificación y estudiando la relación macro-microestructura se pueden correlacionar estos datos con los de textura para generar nuevas formulaciones alimenticias o mejorar las ya existentes.

Dado que Argentina tiene una larga tradición en la producción y el consumo de productos lácteos, la investigación y desarrollo del aprovechamiento del suero lácteo para utilizarlo y convertirlo en productos con mayor valor agregado, brindan proyecciones económicas interesantes a este sector.

Además, el interés por nuevas formulaciones de alimentos nutritivos y funcionales ha aumentado marcadamente en los últimos años. La producción y desarrollo de nuevos productos por las nuevas exigencias de consumo, requieren la aplicación de nuevas tecnologías y la utilización de ingredientes con funcionalidad específica.

El desarrollo de derivados conjugados de proteínas mediante la reacción de Maillard surge como una alternativa muy interesante para producir nuevos aditivos al modificarse las propiedades funcionales de las mismas.

Hay numerosos estudios de conjugados proteína/polisacárido a través de la reacción de Maillard usando diferentes proteínas y polisacáridos. La mayoría de estos estudios se encuentran orientados al estudio de emulsiones y espumas. Sin embargo, son escasos los estudios que expliquen cómo influye la reacción de Maillard, el proceso de gelificación y mecanismo que induce a la gelificación respecto a los precursores, y cuáles son las propiedades mecánicas y texturales finales de los geles formados. Particularmente, hay muy pocos estudios de sistemas de proteínas de suero y dextranos conjugados a través de esta reacción.

2. *OBJETIVOS*

OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis fue estudiar desde el punto de vista básico y aplicado las interacciones de proteínas lácteas con dextranos de diferente peso molecular y los conjugados proteína-polisacárido generados por glicosilación a partir de los mismos, aplicados a la generación de estructuras gelificadas.

Objetivos específicos

- ✓ Estudiar la cinética de glicosilación, el proceso de desnaturalización y agregación de las proteínas de suero conjugadas a dextranos mediante reacción de Maillard, así como su comportamiento en fase acuosa.

- ✓ Profundizar los conocimientos teóricos sobre la generación de estructuras gelificadas de sistemas de proteínas de suero/dextranos mixtos y conjugados, y estudiar sus propiedades mecánicas, texturales y estructurales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales.

Se utilizó un aislado de proteínas de suero lácteo (WPI) provisto por Davisco Foods Internacional Inc. (Minnesota, Estados Unidos). La composición centesimal del mismo, según lo declarado en la ficha técnica, es: $0,4 \pm 0,2$ % de grasa, $2,0 \pm 0,2$ % de cenizas, $4,8 \pm 0,2$ % de humedad y menos del 0,5 % de Lactosa. Según lo determinado mediante ensayo de Kjeldhal, el contenido de proteínas en base seca fue de 97,9 %.

Se usaron dextranos (DX) de 6, 15-25, 40 y 70 kDa. Los mismos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. En las electroforesis en condiciones disociantes se utilizó β -lactoglobulina (Davisco Foods Internacional Inc.) como control.

Ninguno de los materiales fue previamente purificado. Todos los demás reactivos utilizados en esta tesis fueron grado analítico.

3.2. Generación de derivados conjugados y su caracterización.

3.2.1. Obtención de sistemas WPI/DX mixtos y conjugados

En el desarrollo de tesis se hablará de sistemas mixtos (mezcla de proteínas y polisacáridos) y sistemas conjugados (mezcla de proteína y polisacáridos conjugados mediante reacción de Maillard). Ambos conjuntos de soluciones se prepararon a la misma concentración de proteína (12 % p/p), variando la concentración de DX entre 3,6; 7,2 y 10,8 % p/p, lo que corresponde a relaciones de concentración WPI:DX de 1:0,3, 1:0,6 y 1:0,9.

Para la obtención de las soluciones mixtas se mezclaron cantidades de WPI y DX hasta llegar a las concentraciones deseadas. Todas las soluciones fueron preparadas en agua ultrapura y se les agregó 0,02 % de azida de sodio (NaN_3) para prevenir el crecimiento bacteriano. Se les ajustó el pH por medio del agregado de HCl o NaOH 0,1

M, según el caso. Las soluciones fueron preparadas, agitadas durante 30 minutos y mantenidas en la heladera (4 °C) al menos por 24 h antes de ser usadas.

Los conjugados WPI/DX se obtuvieron mediante el método seco a humedad controlada (Broersen et al., 2007; Oliver et al., 2006). La generación de conjugados mediante este método consiste en mezclar soluciones de proteínas y polisacáridos, dejarlas en reposo un cierto tiempo, y liofilizar la mezcla que se convierte en polvo de un determinado tamaño de partícula (para homogeneizar el tamaño se utiliza un tamiz). Luego se colocan los polvos (previamente tamizados) en un ambiente aislado con temperatura y humedad controladas durante cierto tiempo. La actividad de agua (a_w) deseada se puede lograr mediante solución saturada de sales a determinada temperatura. Ejemplos de las a_w obtenidas con distintas sales y temperaturas se encuentran en la **Tabla 3.1**. La actividad de agua óptima para la reacción de Maillard se encuentra entre 0,5 y 0,8 (Labuza & Braisier, 1992; van Boekel, 2001; Oliver et al., 2006).

Tabla 3.1. Actividad de agua de distintas sales a 60°C.

| Sal | a_w |
|-------------------------------------------------|-------------|
| OH | 0,04 |
| LiI | 0,12 |
| K ₂ C ₂ H ₃ OH | 0,20 |
| NaI | 0,30 |
| Mg(NO ₃) ₂ | 0,44 |
| NaBr | 0,49 |
| KI | 0,64 |
| NaCl | 0,75 |
| KCl | 0,80 |
| K ₂ NO ₃ | 0,87 |
| K ₂ SO ₄ | 0,95 |

Los derivados conjugados obtenidos en esta tesis siguieron la técnica descrita anteriormente a distintos tiempos de reacción

Se estudiaron dos conjuntos de sistemas conjugados: con el dextrano de 15-25 kDa se estudió el efecto de los días de reacción; y con los dextransos de 6, 40 y 70 kDa se estudió el efecto del peso molecular.

Se partió de soluciones WPI/DX mixtas (concentración de proteína del 12 % p/p y concentración de DX entre 3.6 y 10.8 % p/p) a pH 7 con agregado de azida de sodio y con 24 hs de reposo a 4°C. Estas soluciones se liofilizaron, y los polvos obtenidos se tamizaron (tamiz ASTM 40 = 420 μm)

Los polvos obtenidos con el DX de 15-25 kDa se incubaron 2, 5 y 9 días a 60°C y a una actividad de agua de $a_w = 0,64$ (obtenida con solución saturada de KI a 60 °C). Los polvos obtenidos con los dextransos de 6, 40 y 70 kDa se incubaron 5 días a la misma temperatura y actividad de agua.

Los días de reacción y la temperatura de incubación fueron elegidos de acuerdo a bibliografía (Jimenez Castaño, Villamiel, Martín-Álvarez, Olano & López-Fandiño, 2005.; 0,65 a_w , 60°C, de 0 a 15 días; Chobert, Gaudin, Dalgarrondo & Haertlé, 2006: a 60°C, 3 días; Wooster & Augustin, 2007: 0,79 a_w , 65°C, 5 o 10 días; Nakamura & Kato, 2000: 0,65 a_w , 60°C, 1-3 semanas; Sun et al., 2011: 0,79 a_w , 60°C y 7 días).

También se incubó WPI al 12% p/p sin DX 2, 5 o 9 días. Estos WPI se llamaron en el desarrollo de la tesis WPI incubados (2, 5 o 9 días), para diferenciarlo del WPI no incubado (o también llamado nativo).

Todos los polvos conjugados fueron mantenidos a -18°C hasta su uso. Un día antes de ser usados, los polvos conjugados fueron disueltos en agua a su concentración original (12 % p/p WPI) obteniendo así las soluciones de los sistemas conjugados. El pH de las soluciones conjugadas se reguló a 7 usando NaOH 0,1 M, porque durante el período de incubación, el pH de los sistemas descendió para la mayoría de los sistemas.

3.2.2. Electroforesis SDS-PAGE

Se realizó electroforesis SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes y reductoras, para confirmar la formación de los conjugados WPI/DX, como se ha reportado en estudios de otros sistemas proteína-polisacárido (Shu, Sahara, Nakamura & Kato, 1996). Se utilizó β -Ig como control, y las muestras fueron WPI no incubado, WPI incubado 2, 5 y 9 días, y los conjugados WPI/DX (muestras correspondientes a WPI con agregado de 7,2 % p/p de DX). La electroforesis se llevó a cabo mediante el procedimiento general de Laemmli (1970) en un equipo Mini-Protean II de Bio-Rad Laboratories (Hercules, Estados Unidos). Se utilizó un gel separador con 1,5 M de Tris-HCl (pH 8,8); 11 % (sistemas con DX 15 kDa) o 15 % (sistemas con DX 6, 40 y 70 kDa) de acrilamida (30 % p/v acrilamida; 0,8 % p/v de bisacrilamida) y 0,1 % p/v de SDS y un concentrador de 0,5 M de Tris-HCl (pH 6,8), 4 % de acrilamida (30 % p/v acrilamida; 0,8 % p/v de bisacrilamida) y 0,1 % p/v de SDS. La polimerización de los geles se inició por el agregado de 10 % p/v de persulfato de amonio y 0,5 % de N, N, N', N'-tetrametil-etilén-diamida (TEMED).

El buffer de muestra contenía 0,5 M de Tris-HCl (pH 6,8), 25 % v/v de glicerol, 0,05 % p/v de azul de bromofenol y 2 % p/v de dodecil sulfato de sodio (SDS) y el buffer de corrida con 0,025 M de Tris-Base (pH 8,3), 0,192 M de glicina y 0,1 % p/v de SDS.

Las muestras fueron mezcladas en una proporción (1:4) con el buffer de siembra y el volumen de siembra fue de 20 μ l conteniendo 40 μ g de proteína por calle.

La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente, a un voltaje de 200 V y una corriente de 500 mA con una duración aproximada de 45 min.

Cada electroforesis se llevó a cabo con dos geles sembrados de la misma manera, que luego fueron coloreados con dos técnicas distintas, una para proteínas y la

otra para glicoproteínas. Para distinguir proteínas los geles fueron teñidos con una solución de Coomassie Blue R-250 (0,1 % p/v en una mezcla 4,5:4,5:1 metanol (CH₃OH):agua:ácido acético glacial (CH₃COOH)) y luego se destiñó con una mezcla 8:1:1 de metanol:ácido acético glacial:agua (Bollag & Edelstein,1991). Para teñir glicoproteínas se utilizó una solución de ácido periódico-Fucsina básica al 0,5% según el método de Zacharius, Zell, Morrison & Woodlock (1969). La técnica aplicada se encuentra descripta en la **Tabla 3.2**.

Tabla 3.2. Técnica de tinción de glicoproteínas según Zacharius et al. (1969).

| Paso | Procedimiento | Tiempo |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1 | 12,5% de ácido tricloroacético (25-50 ml/gel) | 30 min |
| 2 | Enjuagado con agua destilada | 0,25 min |
| 3 | Inmersión en 1% de ácido periódico (hecho en 3% de ácido acético) | 50 min |
| 4 | 6 lavados de 10 min cada uno con 200 ml de agua destilada o toda la noche con pocos cambios | 60 min o toda la noche |
| 5 | Inmersión Fucsina-Sulfito en oscuridad* | 50 min |
| 6 | 3 lavados de 10 min con metabisulfito 0.5% (25-50 ml) | 30 min |
| 7 | Lavar con agua destilada | Toda la noche |
| 8 | Almacenar en 3-7,5% de ácido acético | |

* La preparación de la solución Fucsina-sulfito se realizó de la siguiente manera: 16 g de metabisulfito de potasio + 21 ml de ácido clorhídrico + 2 lts de agua. Luego se agregó 8 g de Fucsina básica y se agitó por 2 hs, luego de 2 hs más se agrega carbón activado G60 por 15 min y se filtra. Luego se guarda refrigerada.

3.2.3. Detección de grupos amino libres mediante la técnica del O-ftaladialdehído (OPA)

El grado de modificación de los grupos amino fue determinado indirectamente por la reacción específica entre OPA y los grupos amino libres de las proteínas (Vigo, Malec, Gomez, & Llosa, 1992; Sun et al., 2011). El OPA es un reactivo fluorogénico que se utiliza para determinar grupos amino, principalmente Lisina (Vigo et al., 1992).

El WPI no incubado, los WPI incubados a distintos días y los conjugados WPI/DX (Sección 3.2.1) fueron solubilizados al 4 % p/p de proteína. A 200 μ l de estas soluciones se les adicionó: 800 μ l de buffer tetraborato 0.1M, 100 μ l de SDS 20% (w/v) y 100 μ l 2-mercaptoetanol. Luego, las muestras fueron inmersas en un baño de agua a 90°C por 5 min.

El reactivo de OPA fue preparado de la siguiente manera: se disolvieron 7,62 g de disodio tetraborato decahidratado con 200 mg de SDS en 150 ml de agua destilada. Luego se agregó 160 mg de OPA disuelto en 4 ml de etanol y 400 μ l de β -mercaptoetanol, se enrasó a 200 ml y se protegió la solución de la luz. Como patrón se utilizó L-serina (26,2mg/25ml; 9,94.10⁻⁴ meq/lit). A 400 μ l del patrón de serina (diluido 1/10) o de la muestra se le adicionaron 3 ml del reactivo OPA, se agitó en vórtex y se midió su absorbancia a 340 nm con un espectrofotómetro Genesis V (Milton Roy) (Sun, Hayakawa, Puangmanee & Izumori, 2006; Sun et al., 2011). A cada muestra se le hizo un blanco de reactivo, agregando para la determinación 400 μ l de muestra y 3ml de agua. Ese valor se restó al valor de absorbancia de la muestra más el reactivo.

Se trazó en cada serie de medidas una curva de calibrado de serina entre 0,0 y 0,003 meq/ml. Cada reacción se realizó por duplicado y se utilizó el promedio de la absorbancia. Para calcular la disminución en los grupos amino libres (GAL) de las

muestras conjugadas, WPI no incubado fue usado como control y referencia (100%), aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ GAL} = A_M / A_{\text{WPI}} * 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

donde A_M es la absorbancia de la muestra y A_{WPI} la absorbancia del WPI control.

3.2.4. Determinación de color de los polvos conjugados

El color es muy importante en la reacción de Maillard, ya que es una característica de la reacción. Hay diferentes métodos para la evaluación del color. De los sistemas propuestos, el más difundido universalmente es el de la CIE (Comisión Internationale de l'Éclairage) (CIE, 1979), en el cual el color es indicado por tres variables X, Y, Z, conocidas como los valores triestímulo y que representan a tres colores primarios virtuales. El valor de Y indica la luminosidad de color (representado por L^* , $L^* = 100\%$ para una muestra blanco o transparente incolora y 0% para el negro), X se puede relacionar con su posición entre rojo y verde (representado por a^* : valores negativos indican verde mientras valores positivos indican rojo) y el Z con su suposición entre amarillo y azul (representado por b^* : valores negativos indican azul y valores positivos indican amarillo), como se representa en la **Figura 3.1**. Por lo tanto, el color queda determinado por un punto en un espacio tridimensional de las coordenadas X, Y, Z.

Para la determinación de color de los polvos conjugados se utilizó un colorímetro triestímulo Minolta modelo 508D/8° 8 mm, que aplica el sistema CIE Lab, definido en coordenadas rectangulares (L^* , a^* , b^*). Se utilizó un iluminante de 65° , y un ángulo de observador de 10° . Los polvos conjugados obtenidos en el punto 3.2.1 fueron tamizados a través de un tamiz ASTM 40 ($420 \mu\text{m}$) antes de las observaciones para

unificar el tamaño de partícula. Luego se les evaluó los parámetros: L^* (luminosidad), a^* (+ rojo, - verde) y b^* (+ amarillo, - azul). Con estos parámetros se calculó el E index: (Chawla, Chander & Sharma, 2009):

$$\Delta E = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

$$\Delta L^* = L^* \text{ muestra} - L^* \text{ control}$$

$$\Delta a^* = a^* \text{ muestra} - a^* \text{ control}$$

$$\Delta b^* = b^* \text{ muestra} - b^* \text{ control}$$

Se utilizó WPI no incubado liofilizado y tamizado como control.

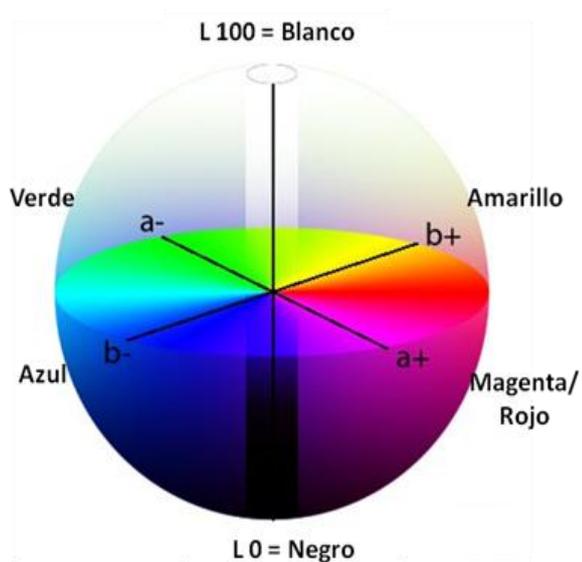


Figura 3.1. Escala de color (x, y, L) CIE Lab 1979 (imagen extraída y adaptada de internet: <http://sobrecolors.blogspot.com.ar>).

3.2.5. Espectroscopia de absorción UV-Visible

Se obtuvieron los espectros de absorbancia con un espectrofotómetro Lambda-20 (Perkin-Elmer, USA) desde los 200 nm hasta 450 nm aproximadamente. Se diluyeron todos los sistemas (WPI no incubado, WPI incubado 2, 5 o 9 días, y sistemas WPI/DX conjugados) hasta llegar a una concentración de proteínas del 0,5 % p/p, lo que conduce en soluciones WPI/DX a una concentración de DX del 0,15; 0,30 y 0,45 % p/p. La velocidad de barrido fue de 240 nm/min y el ancho de slit de 2 nm.

3.2.5.1. Determinación de reactivo de Schiff y compuestos tempranos de la reacción de Maillard

La reacción de Maillard está asociada con el desarrollo de compuestos intermediarios, antes de la generación de pigmentos. Según Chawla et al. (2009), estos productos tempranos de la reacción de Maillard absorben a 284 nm. Según Zhu, Damodaran & Lucey (2008) y Wang & Ismail (2012), a 304 nm absorben las bases de Schiff. Por lo tanto se tomaron medidas puntuales a estas dos longitudes de onda (284 y 304 nm).

3.2.5.2. Intensidad del pardeamiento (Determinación de compuestos tardíos de la reacción de Maillard).

Los compuestos tardíos de la reacción de Maillard son aquellos que se forman en las etapas avanzadas y son los que producen pardeamiento (Ajandouz, Tchiakpe, Dalle Ore, Benajiba & Puigserver, 2001; Lertittikul, Benjakul & Tanaka, 2007; Chawla et al., 2009). La intensidad de los mismos puede ser determinada mediante medidas puntuales de absorbancia a 420 nm (Jiménez-Castaño et al., 2005; Miralles, Martínez-Rodríguez,

Santiago, van de Lagemaat & Heras, 2007). Esta medida se relaciona directamente con el progreso que tuvo la reacción de Maillard en los sistemas estudiados.

3.2.6. Espectroscopia de fluorescencia intrínseca y fluorescencia de productos tardíos de la reacción de Maillard

Los estudios de fluorescencia intrínseca (emisión del triptófano) se realizaron utilizando una longitud de onda de excitación de 295 nm ($\lambda_{ex} = 295$ nm) (Albani, 2004; Broersen et al., 2007), obteniendo los espectros de emisión en el rango de 300-450 nm. Las muestras de WPI no incubado, WPI incubado y conjugados WPI/DX, se disolvieron en agua miliq al 0,5%p/p de proteína y fueron mantenidas a 4°C por 24 hs antes de las determinaciones. La potencia de la lámpara fue de 400 V y la velocidad de barrido de 240 nm/min.

Por otro lado, los productos tardíos de la reacción de Maillard o AGEs (“advanced glycation end products”), formados durante las etapas avanzadas de la RM, presentan una fluorescencia característica, claramente distinguible de la del triptófano en proteínas, con un máximo de excitación y de emisión a longitudes de onda entre 340 y 370 nm y entre 420 y 450 nm, respectivamente. Por ello, la intensidad de fluorescencia de los AGEs es ampliamente utilizada como indicador de las etapas avanzadas de la RM, tanto en sistemas modelo como en muestras biológicas (Leclère & Birlouez-Aragon, 2001; Rufian-Henares, Guerra-Hernández & García-Villanova, 2002; Matiacevich, 2006).

La fluorescencia de los AGEs se midió en un espectrofluorímetro Hitachi F2000 (Japón) y a una longitud de onda de excitación (λ_{ex}) de 365 nm y de emisión (λ_{em}) de 400-500 nm (Chawla et al., 2009). Las medidas fueron realizadas a la misma

concentración que en las mediciones de fluorescencia intrínseca. La potencia de la lámpara y la velocidad de barrido fueron las mismas que en el punto anterior.

3.3. Estudio del comportamiento de los sistemas WPI/DX mixtos y conjugados, durante la desnaturalización térmica y gelificación.

3.3.1. Calorimetría diferencial de barrido

Las propiedades térmicas se estudiaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Para ello, se utilizó un calorímetro diferencial de barrido METLER Toledo modelo DSC821e (Schwerzenbach, Suiza). La concentración total de proteína en todos los sistemas fue 12 % p/p. Los sistemas estudiados fueron: WPI nativo, WPI incubado (2, 5 y 9 días) y sistemas WPI/DX 15-25 kDa conjugados 2 y 5 días (donde la concentración de dextrano fue de 7.2% p/p). El equipo se calibró con Indio (156,6 °C) según Ross & Karel (1991) previamente a los análisis. Se utilizaron cápsulas de aluminio de 160 µl con sellado hermético, donde se colocaron 60 µl de solución, tomando como referencia una cápsula vacía. Las cápsulas se calentaron desde 5 a 100 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

Los termogramas y parámetros térmicos correspondientes a la desnaturalización proteica se obtuvieron mediante el software de STARe 6.1 Thermal Analysis System. Se obtuvieron los siguientes parámetros térmicos:

- Temperatura de inicio o de onset (T_o): determinada como la temperatura obtenida por la intersección de la línea de base con la pendiente descendente de la curva al comenzar la transición térmica (Class, Dalton & Hancock, 1999; Relkin, 1994).

- Temperatura de pico (T_p): Temperatura que corresponde al mínimo de la endoterma. Indica la temperatura aparente de desnaturalización de la proteína.
- Temperatura de finalización o de endset (T_e): Temperatura de finalización de la endoterma.
- Diferencia de entalpía (ΔH) por gramo de proteína: Se calculó como el área de la endoterma y se dividió por los g de proteína en la cápsula.

3.3.2. Reología Dinámica oscilatoria.

Las determinaciones se realizaron en un reómetro oscilatorio dinámico Paar Physica MCR 300 con esfuerzo de corte controlado, utilizando un sistema de platos paralelos (PP30/S) con un gap de 1 mm. Las condiciones de medición fueron evaluadas en la región viscoelástica lineal, siendo la frecuencia de 1 Hz y la deformación del 0,01 %. La temperatura del plato inferior fue controlada mediante un sistema Peltier y un baño termostatzado (Viscotherm VT2, Paar Physica).

Se colocaron 750 μ l de solución en cada determinación. Se estudiaron los siguientes sistemas: WPI no incubado, WPI incubado 2, 5 y 9 días y sistemas WPI/DX mixtos y conjugados (a todos los días de reacción: 2, 5 o 9 días) con una concentración de proteína del 12 % p/p y una concentración de dextrano de 7,2 % p/p, para todos los pesos moleculares (6, 15-25, 40 y 70). Luego de colocar la muestra se aplicó silicona líquida con el objetivo de prevenir la evaporación de agua de la muestra.

Para determinar cinética de gelificación se utilizó la siguiente rampa de calentamiento: un aumento a una velocidad de 5 °C/min desde una temperatura inicial de 25 °C hasta 90 °C, manteniendo 90 °C por 10 minutos, disminución de 90 °C a 25 °C a una velocidad de 25 °C/min y por último, mantención durante 10 minutos a 25 °C.

Se registró la evolución del módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G'') y la tangente del ángulo de pérdida ($\tan \delta$) en función del tiempo y la temperatura. La $\tan \delta$ indica el carácter viscoelástico del material y se calcula como la relación entre la componente viscosa y la elástica (Ec. 3):

$$\tan \delta = G''/G' \quad (\text{Ec. 3})$$

Si bien hay muchos métodos para precisar el punto de gelificación (Stading y Hermansson, 1990) de una dispersión de proteínas, se utilizó el punto de cruce entre el módulo elástico (G') y el viscoso (G''). El cruce de G' y G'' indica la formación de una red del gel infinita con continuidad estructural (Tavares & Lopes da Silva, 2003), ya que se produce la transición de una estructura viscosa (sol) a una viscoelástica (gel) durante el calentamiento (Clark, 1992), momento en el cual el ángulo de desfase es de 45° y la $\tan \delta$ es igual a 1.

Según las condiciones de calentamiento, puede determinarse el tiempo de gelificación (t_{gel}) a una temperatura constante de calentamiento (usualmente superior a la temperatura de desnaturalización de la proteína) o la temperatura de transición (T_{gel}), si se registra la variación de los parámetros mediante el uso de una rampa a una baja velocidad de calentamiento.

Si bien con el uso de una rampa de calentamiento, el valor obtenido sería la temperatura de transición (T_{gel}), en algunos sistemas se observó que la gelificación ocurría en la etapa de temperatura constante (10 min a 90°C), entonces el parámetro obtenido fue el tiempo de gelificación (t_{gel}) a esa temperatura (90°C), y a modo comparativo se calcularon los tiempos de gelificación de todos los sistemas, aunque el cruce se diera en la etapa de calentamiento.

Luego de esta medición y antes de retirar la muestra del sistema, se realizó un barrido de frecuencia a una deformación de 1 %, entre 0,01 y 10 Hz. La dependencia del módulo elástico con la frecuencia da información sobre el tipo de estructura que presenta el gel (Stading & Hermansson, 1992). El grado de dependencia de G' con la frecuencia puede ser expresado por medio de la constante n según la ecuación 4:

$$\log G' = n \log f + k \quad (\text{Ec. 4})$$

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

Los valores informados son el promedio de dos determinaciones con su correspondiente desviación estándar.

3.4. Obtención de geles mixtos y conjugados.

Tanto las soluciones mixtas como las conjugadas obtenidas en el punto 3.2.1 se volcaron en cilindros de vidrio (1,5 cm de diámetro y 5 cm de alto) recubiertos interiormente con aceite siliconado y fueron tapados por ambos lados con tapones de goma. Luego se colocaron en baño termostático a 80°C durante 30 minutos para obtener los geles inducidos por calor. Los mismos se mantuvieron a 4°C, por lo menos 24 hs, antes de realizar los análisis pertinentes.

3.5. Estudio de las propiedades mecánicas y texturales de geles.

3.5.1. Compresión Uniaxial

Las medidas fueron llevadas a cabo con una máquina universal de ensayos Instron (modelo 3344, Instron Corp., Norwood, USA), con un disco de teflón de 50 mm

de diámetro. Este disco fue previamente lubricado con aceite siliconado para minimizar la fricción al realizar los ensayos.

Las muestras de gel fueron cilindros de 1.5 cm de altura y 1.5 cm de diámetro. Los ensayos se realizaron a 22°C, comprimiendo los geles hasta ruptura, a una velocidad de 1 mm/s. Los datos obtenidos fueron fuerza (F(t)) y altura (o extensión) (H(t)) en función del tiempo. Con ellos se calcularon el esfuerzo de Hencky (σ_H), que puede ser definido como:

$$\sigma_H = F(t) \cdot \frac{H(t)}{(H_o \cdot A_o)} \quad (\text{Ec. 5})$$

Similarmente, se calculó la deformación de Henky (ϵ_H) en función del tiempo como:

$$\epsilon_H = -\ln\left(\frac{H(t)}{H_o}\right) \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde F(t) y H(t) son la fuerza y la altura a un determinado tiempo; A_o y H_o el área y altura inicial del gel, respectivamente (Steffe, 1992).

Los parámetros calculados a partir de los datos de compresión fueron:

- Esfuerzo máximo a la fractura (σ_M): máximo valor durante el ensayo calculado a partir de la Ec. 5.
- Deformación máxima (ϵ_M) máximo valor calculado con la Ec. 6.
- Wf: trabajo de fractura asociado a la dureza; es calculado como el área bajo la curva (σ_H vs. ϵ_H) entre 0 y ϵ_M .
- Módulo de Young (E): calculado como la pendiente de la región lineal e inicial de la curva σ_H vs. ϵ_H (5% de deformación).
- Deformación a la ruptura (Def. Rupt.) (%): es la deformación en el punto de fractura y se calcula como:

$$\text{Def. Rupt. (\%)} = (H_F - H_0)/H_0 \times 100 \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde H_F es la altura final y H_0 es la altura inicial del gel, respectivamente (Spotti et al., 2012).

3.5.2. Determinación del tamaño de poro.

El tamaño de poro se calculó a partir de la teoría de elasticidad de gomas (Aklonis, Mc Knigh & Shen, 1972) empleando la siguiente ecuación (Ec. 8):

$$\xi = \left\{ \frac{3 \cdot K_b \cdot T}{E} \left(\frac{r_0^2}{r_f^2} \right)^{1/3} \right\} \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde: ξ es el tamaño de poro; K_b es la constante de Boltzmann; T es la Temperatura en Kelvin; E es el módulo de Young; (r_0^2 / r_f^2) es la desviación promedio de las dimensiones de las cadenas de la red que tendrían si fueran cadenas libres y aisladas (front factor). Para redes covalentes el valor de este factor es aproximadamente 1.

3.6. Caracterización de la microestructura de los geles formados

Las proteínas de los sistemas mixtos y conjugados fueron teñidas de forma no covalente mediante el agregado de 10 μ l de Rodamina B (1mg/ml) por g de proteína en solución, agitando hasta la homogeneidad (Spotti et al., 2012).

El dextrano de 40 kDa fue covalentemente teñido con Fluoresceína Isotiocianato (Fluorescein isothiocyanate, FITC). El protocolo de marcado covalente se basó en un método publicado por Lamprecht, Schäfer & Lehr (2000) con algunas modificaciones. Se preparó 100 ml de una solución acuosa de DX 40 kDa al 2,5% (p/v) y se ajustó el pH a 8,5 mediante hidróxido de sodio 1 N. Se disolvió FITC en dimetil sulfóxido a una

concentración de 1 mg/ml. Luego, 100 ml de la solución de tinte fue adicionada a la solución del DX y agitada durante 1 h a 40°C. La reacción se paró mediante la adición de 50 ml de etanolamina, y el FITC libre se removió mediante diálisis. Esta solución fue liofilizada, y con el polvo FITC-DX resultante, se obtuvo una solución mixta WPI/FITC-DX donde la concentración de WPI fue del 12 % p/p y la de DX fue de 7,2% p/p.

Todas las soluciones coloreadas se vertieron en cilindros de vidrio con tapones de goma. Los cilindros fueron colocados en un baño de agua a 80°C durante 30 min, y luego fueron mantenidos a 4°C al menos 24 h antes de las observaciones. Los geles fueron desmoldados antes de las observaciones.

Se utilizó un microscopio invertido con sistema motorizado y óptica DIC/Nomarski, Nikon Modelo Eclipse TE-2000-E2 (Japón) de óptica corregida al infinito. Las observaciones se realizaron mediante excitación de la Rodamina B a 544 nm y del FITC a 485 nm, recogiendo la emisión desde 550 a 750 nm. Se utilizaron, para todas las muestras, un objetivo de 40X y un zoom de 10 (imagen de 1024 x 1024 píxeles). Cada imagen fue compuesta de 1024 x 1024 píxeles con una profundidad de campo de 63.6 x 63.6 μm .

3.7. Análisis estadístico.

Las determinaciones se hicieron al menos por duplicado y los resultados se presentan como valor medio \pm error estándar (a menos que en la descripción de la técnica diga desviación estándar). Se aplicó ANOVA de una variable, según el caso, para determinar diferencias significativas entre las distintas condiciones de ensayos (Statgraphics Centurion XV).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

***4.1. Sistema WPI/DX (15-25 kDa): Efectos de
los días de reacción***

4.1. SISTEMA WPI/DX (15-25 kDa): Efecto de los días de reacción

4.1.1. Electroforesis SDS-PAGE (sistemas conjugados DX 15-25 kDa)

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes con β -mercaptoetanol como agente reductor, para confirmar la unión covalente entre las proteínas y el dextrano durante el tratamiento de secado a humedad controlada. Los geles del SDS-PAGE se presentan en la **Figura 4.1 A y B**. En la **Figura 4.1 A** se observan los componentes proteicos identificados con una tinción con Coomassie Blue y en la **Figura 4.1 B**, se observan los conjugados proteína-polisacárido teñidos con Fucsina básica.

En la **Figura 4.1 A** se observa que en la calle 1 están las bandas que corresponden a la β -lg (18 kDa), que también están presentes en la calle 2 del WPI no incubado. Las muestras de WPI incubados a 2, 5 y 9 días (calles 3, 5 y 7, respectivamente) presentaron bandas menos definidas que las calles 1 y 2, pero en la misma posición.

En la **Figura 4.1 A**, las calles 4, 6 y 8, correspondientes a los conjugados WPI/DX 15-25 kDa incubados 2, 5 y 9 días respectivamente, presentan cambios con respecto a las calles de la β -lg y WPI no incubado, y a las del WPI incubado 2, 5 y 9 días. Cuando la reacción de glicosilación procede, hay una desaparición de las bandas características del WPI, y en su lugar aparece una intensificación del color azul en toda la calle sin la aparición de nuevas bandas definidas, lo que indica que la movilidad de las proteínas en el desarrollo de la corrida cambia considerablemente, probablemente debido a la unión covalente del DX a las proteínas. Resultados similares fueron encontrados por Akhtar & Dickinson (2007), trabajando con sistemas WPI/maltodextrinas de 8,7 y 280 kDa, siguiendo un método de obtención de los conjugados similar al de la presente tesis y sin purificación de la proteína y el polisacárido no unido de los conjugados

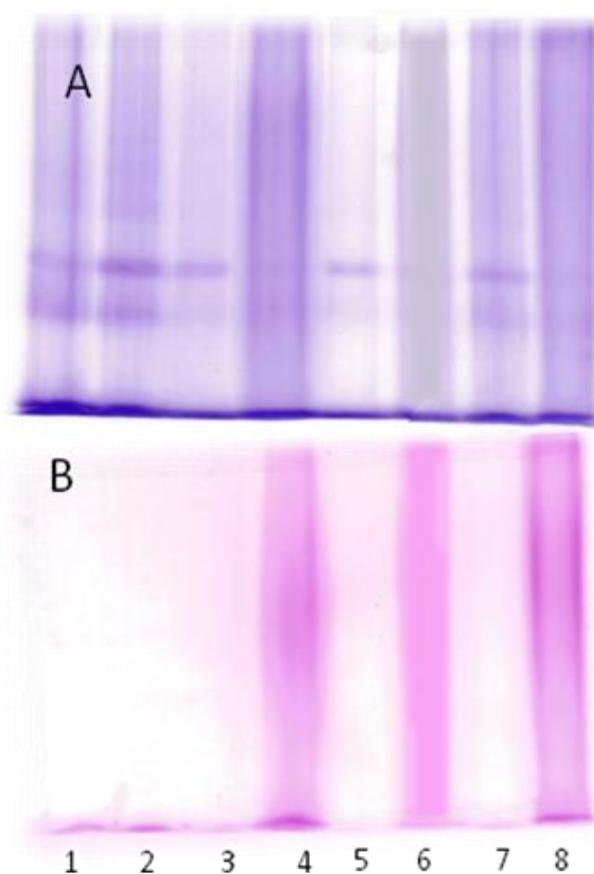


Figura 4.1. Electroforesis de conjugados WPI DX (15-25 kDa). Calle 1: β -lg; calle 2: WPI no incubado; calle 3, 5 y 7: WPI incubado 2, 5 y 9 días, respectivamente; calle 4, 6 y 8: conjugado WPI/DX (7,2% de DX) incubado 2, 5 y 9 días, respectivamente. (A): Marcado con Coomassie Blue (tinción de proteínas), (B): Marcado con Fucsina básica (tinción de glicoproteínas).

Por otro lado, la tinción con Fucsina básica (**Figura 4.1 B**) revela que no hay presencia de glicoproteínas en las calles 1, 2, 3, 5 y 7, que corresponden a la β -lg y a los WPI incubados 2, 5 y 9 días, respectivamente, mientras que en las calles 4, 6 y 8 se puede observar la presencia de glicoproteínas.

Si bien no es posible determinar cuál es el peso molecular de los compuestos conjugados, se puede concluir que se produjeron cambios en los sistemas WPI/DX estudiados

y que la reacción de Maillard se llevó a cabo exitosamente. Similares resultados fueron encontrados por Dunlap & Coté (2005) con una técnica similar de tinción de glicoproteínas, donde trabajaron con β -Ig conjugada a dextranos de distintos pesos moleculares (DX de 19,6 - 87 - 150 - 500 y 2000 kDa). Si bien en el trabajo citado las muestras fueron purificadas previamente a la electroforesis (por cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular), se detectó la presencia de conjugados mediante la presencia de bandas difusas a lo largo del gel. Otros trabajos donde se obtuvieron resultados similares, pero sin purificación previa, fueron los de Nakamura & Kato (2000) y Matsudomi et al. (2002), trabajando en sistemas de proteínas de huevo/galactomanano. En todos los casos se obtuvieron bandas anchas y difusas cuando los geles fueron teñidos tanto con Coomassie blue como con Fucsina básica, similares a las mostradas en la presente tesis.

4.1.2. Cuantificación de grupos amino libres (sistemas conjugados DX 15-25 kDa)

Para determinar el grado de conjugación entre las proteínas del suero y los dextranos es muy utilizada la cuantificación del cambio en el contenido de grupos amino libres. Para ello, se utiliza la técnica del o-ftaldialdehído (OPA) (Sun et al., 2011). El mismo determina el número de grupos amino que no ha reaccionado y refleja un número promedio de ensamblajes. En la **Figura 4.2** se muestra la cuantificación de los grupos amino libres tomando como referencia el WPI no incubado.

El primer punto de cada serie, que corresponde a 0% de DX, es el WPI incubado a los distintos días estudiados. Como se puede observar, hay una disminución de grupos amino, pero no es significativa. Esto podría deberse a que durante la incubación se podrían conjugar las proteínas con los restos de lactosa presentes en el WPI (aproximadamente 0,5%). Resultados similares fueron obtenidos por Chobert et al. (2006) trabajando con β -Ig incubada 3 días a 60°C.

En los sistemas WPI/DX hay una disminución de estos grupos conforme aumentan tanto los días de reacción como la concentración de DX. Hay una disminución más acentuada en el contenido de grupos amino libres en aquellos sistemas con más concentración de DX, ya que hay más grupos carboxilo con posibilidad de reaccionar con las proteínas. Como cada molécula de polisacárido (dextrano) tiene un solo grupo carbonilo reductor capaz de reaccionar con los grupos amino de las proteínas, es razonable que el progreso de la formación de los conjugados aumente con un aumento en la proporción de polisacáridos.

Por otro lado, si tenemos en cuenta los días de reacción, los conjugados que presentaron menos grupos amino libres para todas las concentraciones estudiadas fueron los conjugados de 9 días. Esto es esperable teniendo en cuenta que a mayor tiempo de reacción, más progreso tiene la misma.

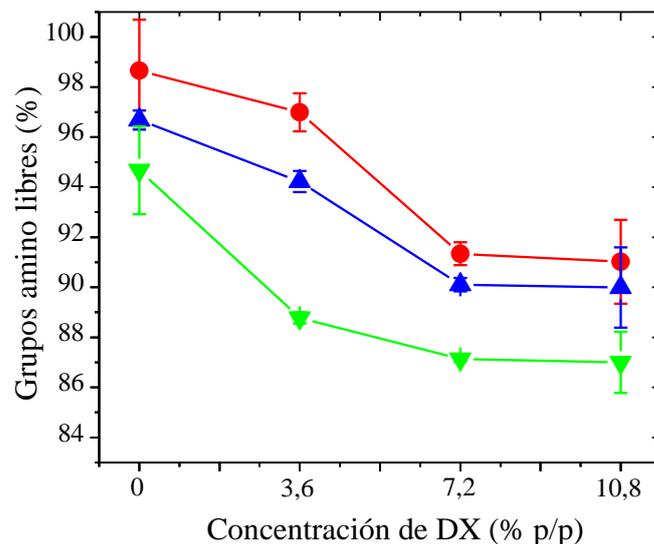


Figura 4.2. Cuantificación de grupos amino libres (GAL) mediante la técnica del OPA, según los días de reacción de sistemas conjugados WPI/DX (15-25 kDa) incubados 2 (●), 5 (▲) y 9 días (▼) para todas las concentraciones estudiadas, con respecto a WPI no incubado (100% GAL).

Hay que tener en cuenta que cada proteína en el WPI tiene múltiples grupos amino potencialmente reactivos. Sin embargo, a pH 7 la mayoría de los grupos amino (>99%) están en la forma protonada, y por lo tanto no son reactivos. A pH 7 solo el NH₂ terminal de las proteínas está en forma nucleofílica reactiva (Zhu et al., 2008). El aminoácido lisina tiene dos grupos amino, uno que está en la posición α , involucrado en la unión peptídica, y el grupo ϵ -amino de la cadena lateral, que es el que más fácilmente reacciona con los grupos carbonilos reductores. Sin embargo, a pH = 7 la cadena lateral de la lisina se encuentra cargada (-NH₃⁺).

4.1.3. Determinación de parámetros de color (sistemas conjugados DX 15-25 kDa)

Objetivamente el desarrollo de color fue medido mediante los parámetros CIE Lab (**Tabla 4.1**). Si observamos el WPI no incubado con respecto al WPI incubado 2, 5 y 9 días podemos ver que hay diferencias en cuanto a los parámetros a*, b* y L*, pero estas diferencias son mínimas con respecto a los sistemas WPI/DX. Con la mínima concentración de DX y al menor tiempo de reacción, ya se observan cambios en los parámetros a*, b* y L*. Los parámetros a* (+ rojo, - verde) y b* (+ amarillo, - azul) aumentan a medida que aumenta la concentración de DX para los sistemas a 2 y 9 días de incubación, mientras que a 5 días no hay una tendencia de color definida, pero sí hay un aumento en los parámetros a* y b* con respecto al WPI incubado correspondiente y al WPI no incubado. Cuando aumentan los días de reacción, este aumento en a* y en b* es mayor para los conjugados de 9 días. El a* aumenta hacia el rojo y el b* hacia el amarillo, indicando que a medida que progresa la reacción se desarrolla un color marrón-rojizo. El parámetro L, que indica luminosidad, disminuye a medida que aumenta la concentración de DX agregada y los días de reacción. Los cambios de estos parámetros estarían indicando que se produce un avance de la reacción de glicosilación, como fue indicado por el ensayo de OPA.

Tabla 4.1. Parámetros CIE Lab de polvos WPI/DX (15-25 kDa) incubados 2, 5 y 9 días de reacción, a todas las concentraciones estudiadas.

| Días | Conc DX (% p/p) | a* | b* | L* | ΔE |
|------|--------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0 | 0 | 0,30 ± 0,01 | 11,0 ± 0,1 | 88,9 ± 0,0 | 0 |
| | 0 | -0,25 ± 0,01 ^a | 11,98 ± 0,0 ^a | 89,31 ± 0,0 ^a | 1,22 ± 0,01 ^a |
| 2 | 3,6 | 3,85 ± 0,05 ^b | 22,77 ± 0,1 ^b | 84,7 ± 0,26 ^b | 13,01 ± 0,22 ^d |
| | 7,2 | 3,94 ± 0,01 ^c | 22,54 ± 0,0 ^b | 84,52 ± 0,1 ^b | 14,56 ± 0,06 ^e |
| | 10,8 | 4,18 ± 0,02 ^d | 24,29 ± 0,0 ^c | 84,70 ± 0,0 ^b | 12,84 ± 0,01 ^d |
| 5 | 0 | -0,02 ± 0,01 ^a | 11,70 ± 0,0 ^a | 90,59 ± 0,1 ^a | 1,86 ± 0,13 ^b |
| | 3,6 | 4,87 ± 0,09 ^b | 28,32 ± 0,2 ^b | 81,94 ± 0,3 ^b | 19,26 ± 0,37 ^g |
| | 7,2 | 4,19 ± 0,02 ^c | 24,06 ± 0,1 ^c | 84,68 ± 0,0 ^c | 14,27 ± 0,12 ^e |
| | 10,8 | 4,09 ± 0,01 ^c | 24,35 ± 0,1 ^c | 84,47 ± 0,0 ^c | 14,63 ± 0,19 ^e |
| 9 | 0 | -0,07 ± 0,01 ^a | 13,27 ± 0,07 ^a | 89,92 ± 0,03 ^a | 2,54 ± 0,07 ^c |
| | 3,6 | 5,66 ± 0,02 ^b | 27,10 ± 0,07 ^b | 82,02 ± 0,15 ^b | 18,35 ± 0,12 ^f |
| | 7,2 | 8,97 ± 0,06 ^c | 31,03 ± 0,17 ^c | 76,14 ± 0,18 ^c | 25,32 ± 0,25 ^h |
| | 10,8 | 10,09 ± 0,08 ^d | 32,55 ± 0,14 ^d | 73,63 ± 0,21 ^d | 28,20 ± 0,26 ⁱ |

Los valores con las mismas letras no arrojaron diferencias significativas al aplicar la prueba de Duncan con $\alpha = 0,05$. Los ΔE se calcularon teniendo como referencia el WPI liofilizado no incubado.

Por otro lado, para todos los días de reacción, el cambio en el color (ΔE) de los sistemas aumenta con el aumento en la concentración de DX con respecto al ΔE del WPI incubado correspondiente. También se observa una tendencia a un mayor ΔE a medida que aumentan los días de reacción.

El desarrollo de color también se puede observar visualmente en los geles, como se puede observar en la **Figura 4.3**.

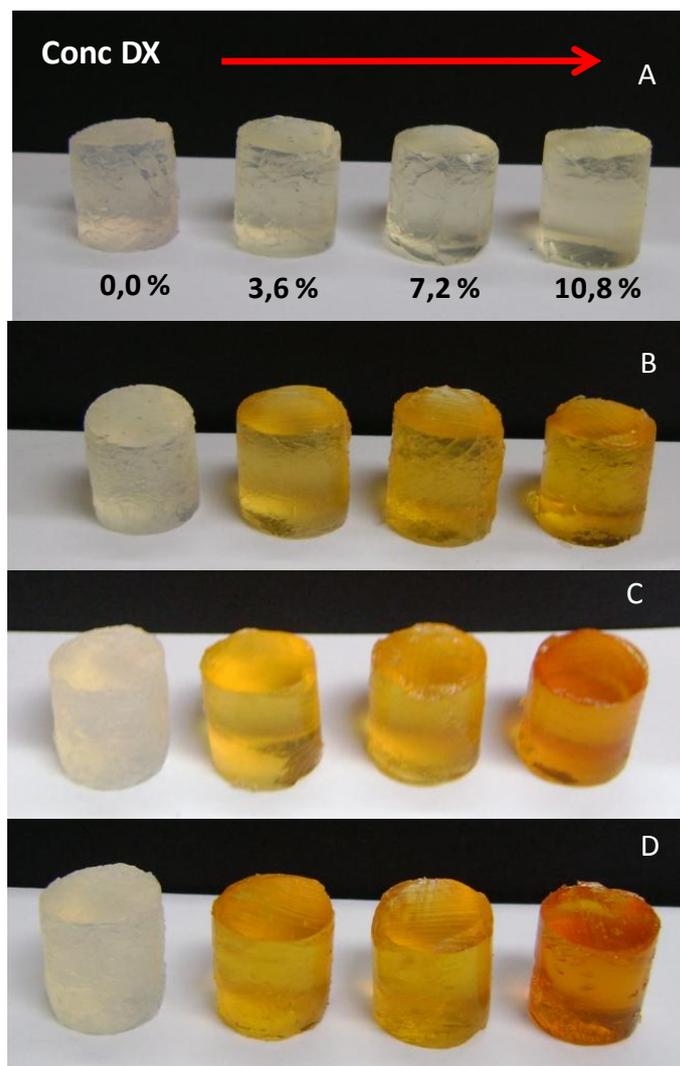


Figura 4.3. Fotografía de geles mixtos WPI/DX (15-25 kDa) (A) y geles conjugados WPI/DX (15-25 kDa) incubados 2 (B), 5 (C) y 9 (D) días y a todas las concentraciones.

Como se puede observar, los geles mixtos son casi transparentes, aún para las más altas concentraciones de DX agregado. Los geles transparentes a menudo son geles formados por arreglos supramoleculares ordenados consistentes en finas hebras (Pilosof, 2000; Hudson, Daubert & Foegeding, 2000). En este caso el agregado de DX no obstaculizaría el ordenamiento molecular de las proteínas que forman los finos filamentos de la red de este tipo de gel.

Por otro lado, podemos observar que los geles de WPI/DX conjugados son coloreados aunque translúcidos. El desarrollo de color aumenta a medida que aumenta la concentración de DX, como también los días de incubación, es decir, a medida que la reacción progresa. Sin embargo, ninguno de los geles de WPI incubado (2, 5 o 9 días) sin dextrano presenta desarrollo de color. La opacidad de estos geles es muy leve si la comparamos con el gel de WPI no incubado. Esto estaría coincidiendo con los valores de los parámetros a^* , b^* y L^* , indicando que la incubación por sí misma no afecta de manera significativa la apariencia de los geles, y sí lo hace la presencia del polisacárido (dextrano).

4.1.4. Absorción UV-Vis (sistemas conjugados DX 15-25 kDa)

Se determinó el espectro de absorción de las muestras en función de la longitud de onda (λ) entre 200 y 450 nm para todos los sistemas WPI/DX (15-25 kDa) estudiados (**Figura 4.4**). Para que las diferencias en los espectros sean más evidentes, se graficaron las diferencias en el espectro de absorción UV (DUV) de todos los sistemas en estudio con respecto al WPI no incubado (Zhu et al., 2008).

Como se puede observar, la absorbancia de las muestras varía en función de la concentración de dextrano y de los días de reacción. Hay un fuerte aumento en la absorbancia de los conjugados en las proximidades de 250 y 300 nm, que según Fogliano, Monti, Musella, Randazzo & Ritieni (1999), es debido a la formación de pre-melanoidinas solubles. Este aumento en la absorbancia es más pronunciado a mayor concentración de dextrano y a mayor tiempo de reacción, ya que en estas condiciones la reacción de Maillard tiene un mayor progreso, como se vio en el análisis de grupos amino libres y desarrollo de color (Sección 4.1.2).

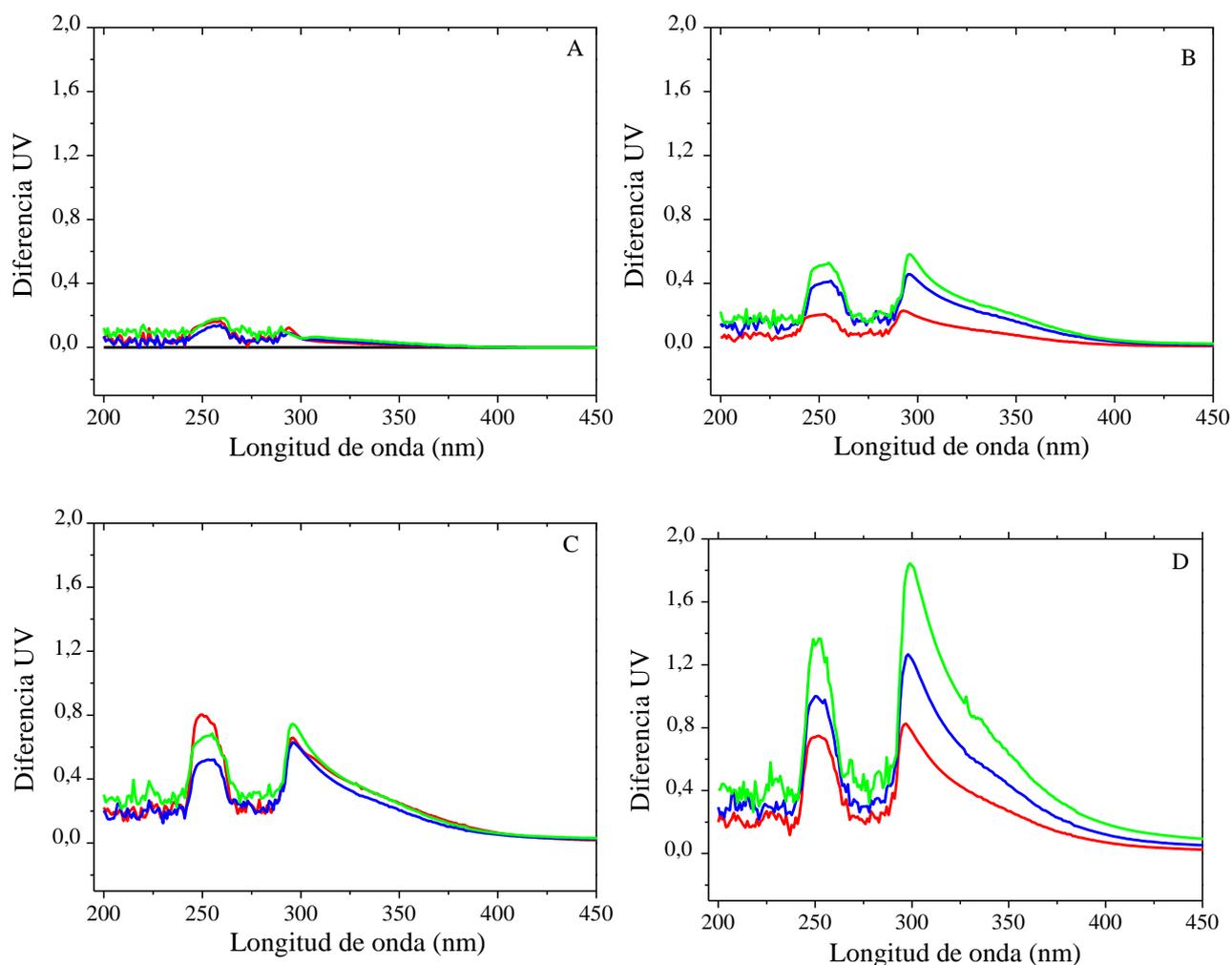


Figura 4.4. Diferencia de espectros UV con respecto al WPI no incubado de WPI no incubado (—), WPI incubado 2 (—), 5 (—) y 9 días (—) (A); sistemas WPI/DX incubados 2 (B), 5 (C) y 9 días (D), donde la concentración de DX es 0,15 (—); 0,30 (—) y 0,45 % p/p (—).

Se tomaron medidas puntuales a 284 nm, ya que según Chawla et al. (2009) a esa λ absorben las bases de Schiff, y a 304 nm absorben los compuestos de Amadori según Zhu et al., (2008) y Wang & Ismail (2012). Estas medidas puntuales se graficaron en función de la concentración de DX. Como se puede observar en la **Figura 4.5 A y B**, a mayor concentración de DX y a mayor tiempo de reacción se evidencia una mayor absorción,

indicando una mayor presencia de intermediarios reactivos, y por lo tanto un mayor progreso de la misma.

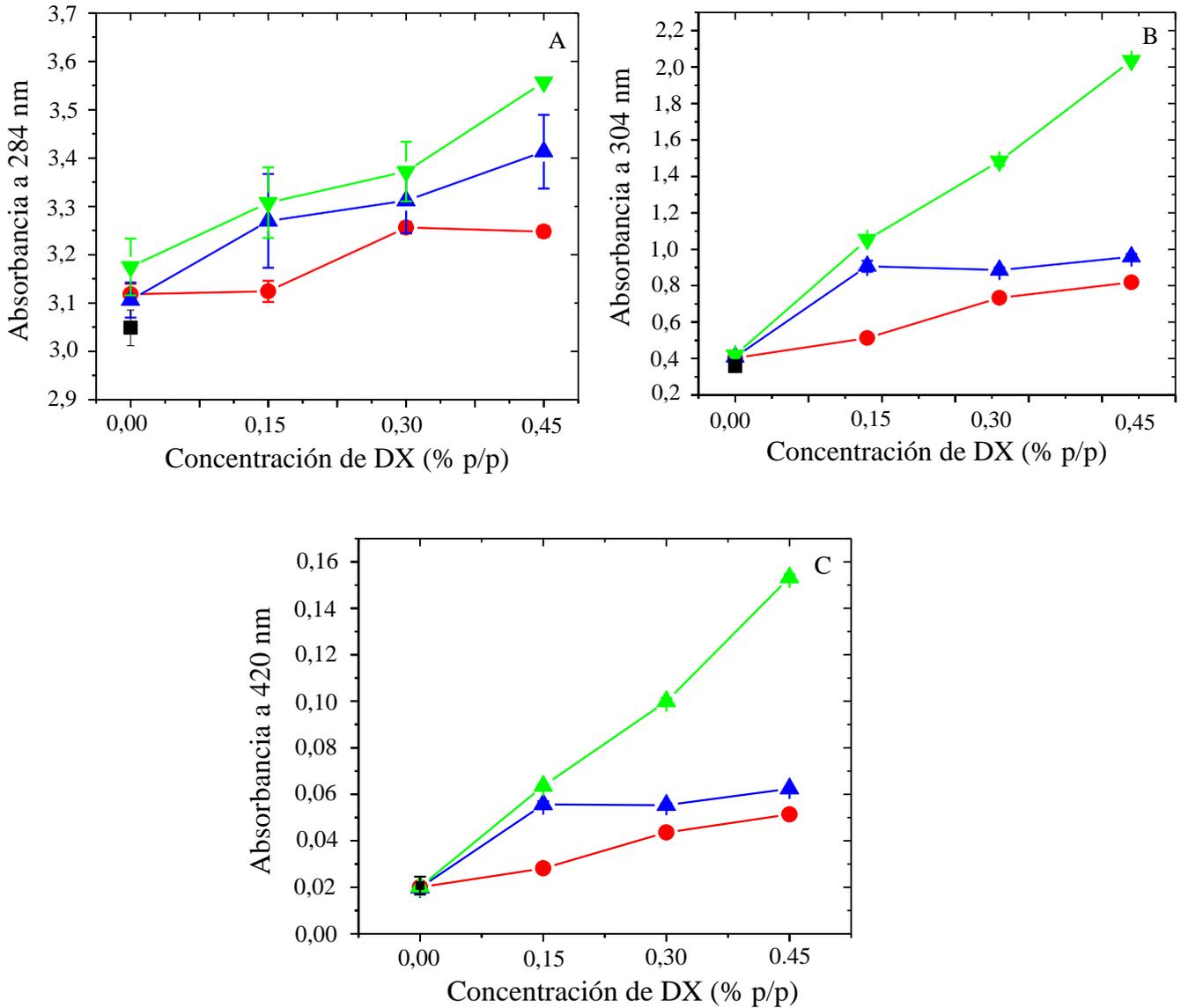


Figura 4.5. (A): Absorbancia de compuestos intermediarios tempranos de la reacción de Maillard, absorbancia a 284 (A) y 304 nm (B), y absorbancia de compuestos intermediarios tardíos de la reacción de Maillard (absorbancia a 420 nm) (C) de sistemas WPI no incubado (■); y sistemas WPI/DX incubado 2 (●), 5 (▲) y 9 días (▼).

Si bien a 284 nm hay diferencias entre los días de reacción a una misma concentración de DX, estas diferencias son mucho más apreciables a 304 nm, sobre todo para los conjugados WPI/DX con 0,30 y 0,45 % p/p de DX incubados 9 días. En la **Figura 4.5 (C)** se observa la intensidad de pardeamiento mediante las medidas de absorbancia a 420 nm, lo que indicaría la presencia de intermediarios tardíos de la reacción de Maillard. Como es de esperarse, a mayor tiempo de reacción, mayor absorción a 420 nm, ya que la reacción presenta un mayor progreso. La misma tendencia se observa cuando aumenta la concentración de dextrano, ya que hay más grupos carbonilos reactivos disponibles.

La **Figura 4.5 C** es muy similar a la **Figura 4.5 B**. Esto podría indicar que la formación de los compuestos de Amadori y la formación de los compuestos coloreados ocurre a la misma velocidad. También se puede observar que a los 9 días de incubación la diferencia en la absorbancia de los sistemas WPI/DX con 0,30 % p/p y 0,45 % p/p de DX es mucho más alta que para los demás sistemas, coincidiendo con los valores a^* y b^* de la **Tabla 4.1**. Resultados similares fueron encontrados por Fogliano et al. (1999) cuando estudiaron el desarrollo de color en sistemas secos y húmedos de gluten y glucosa a varios tiempos de reacción. Diferentes autores han relacionado el desarrollo de color marrón a la formación de polímeros coloreados de alto peso molecular (melanoidinas). Hofmann (1998), estudiando un sistema caseína-glucosa, elucidó las estructuras químicas de varios cromóforos formados e hipotetizó que la principal parte del color está dada por pequeños componentes los cuales se unen a las cadenas laterales de las proteínas formando oligómeros. Hay que destacar que los compuestos coloreados pueden ser solubilizados en diferentes solventes. En el presente estudio se disolvieron en agua, siendo imperceptibles (por lo menos a simple vista) restos insolubles, tanto en soluciones concentradas (12% p/p de proteínas) como en soluciones diluidas (0,5 % p/p).

4.1.5. Fluorescencia intrínseca (sistemas conjugados DX 15-25 kDa)

La fluorescencia intrínseca de la proteína está originada por aminoácidos aromáticos, como triptófano (Trp), tirosina, y fenilalanina. La emisión de fluorescencia del Trp es altamente sensible al ambiente local, y esto es frecuentemente utilizado como grupo indicador para los cambios conformacionales de las proteínas, ya que el máximo de emisión de las proteínas refleja el promedio de los residuos triptófano expuestos a la fase acuosa (Lakowicz, 1999; Matiacevich, 2008), y se puede inferir si hubo o no cambios en la estructura terciaria de la proteína (Broersen, Voragen, Hamer & de Jongh, 2004). En la **Figura 4.6** se observa el espectro de emisión de fluorescencia intrínseca del WPI nativo (no incubado) y del WPI y sistemas WPI/DX incubados 2, 5 y 9 días, utilizando una $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$.

La intensidad de fluorescencia aumenta ligeramente en las proteínas incubadas en ausencia de DX, lo que podría indicar cambios estructurales debidos a desnaturalización por el tiempo de incubación a 60°C. El calentamiento de las proteínas de suero aumenta la intensidad de fluorescencia y esto fue asociado con desnaturalización parcial (Jiménez-Cataño et al., 2005), ya que los grupos responsables de la fluorescencia quedan más expuestos en el estado desnaturalizado, emitiendo mayor fluorescencia

En el caso de los conjugados, la intensidad de fluorescencia de los sistemas WPI/DX es menor que para los WPI incubados correspondientes. Esta disminución en la emisión de fluorescencia se acentúa cuando la concentración de DX y los días de incubación aumentan. Esto puede ser debido a la formación de los productos de la reacción de Maillard, que podrían estar impidiendo la emisión de la fluorescencia. Se sabe que luego de la condensación entre el grupo amino de las proteínas y carboxilo del polisacárido se producen derivados que luego polimerizan. Estos polímeros podrían ser los responsables de la falta de emisión de fluorescencia. Hattori, Nagasawa, Ametani, Kaminogawa & Takahashi (1994) y Hattori, Numamoto, Kobayashim& Takahashi (2000), encontraron que la intensidad de fluorescencia

de conjugados de β -lg/carboximetil dextrano y de β -lg/carboximetil ciclodextrina fue menor que de las proteínas nativas, y esto fue atribuido a un efecto de movimiento de la cadena de polisacárido unida a la β -lg. Resultados similares fueron encontrados por Jimenez-Castaño et al. (2007) trabajando con β -lg y dextranos.

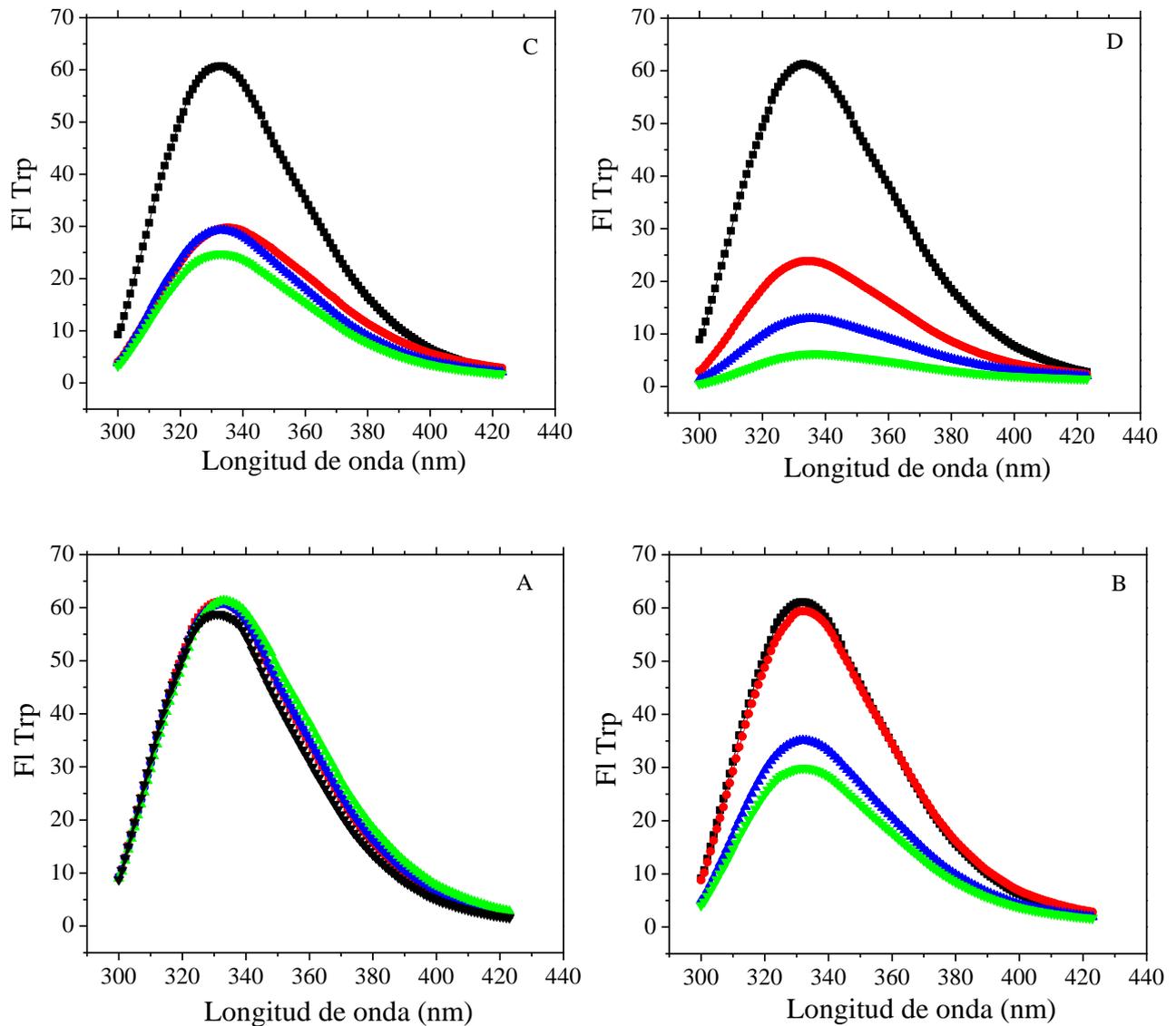


Figura 4.6. Fluorescencia intrínseca de soluciones WPI (A) no incubado (■), WPI incubado 2 (●), 5 (▲) y 9 (▼) días y WPI/DX conjugados por Reacción de Maillard a 2 (B), 5 (C) y 9 (D) días de reacción (WPI con 0 (■); 0,15, (●), 0,30 (▲) y 0,45 % p/p (▼) de DX de 15-25 kDa.

4.1.6. Fluorescencia de productos de la reacción de Maillard (sistemas conjugados DX 15-25 kDa)

En la **Figura 4.7** se encuentra la emisión de fluorescencia de los sistemas WPI y WPI/DX incubados 2, 5 y 9 días a las distintas concentraciones estudiadas, cuando fueron excitados con una λ_{ex} de 365 nm (Chawla et al., 2009).

Los WPI incubados 2, 5 y 9 días presentan una muy leve intensidad de fluorescencia, mientras que la presencia de DX la aumenta considerablemente. En los sistemas WPI/DX, la emisión de fluorescencia aumenta a medida que aumenta la concentración de DX. Comparando los distintos gráficos también podemos observar un aumento en la emisión de fluorescencia a medida que aumentan los días de reacción a una misma concentración.

El desarrollo de compuestos fluorescentes debidos al desarrollo de la reacción de Maillard (RM) fue descrito en varios sistemas modelos, biológicos y en alimentos, en trabajos previamente publicados (Matiacevich, 2008) y fue ampliamente comprobado en numerosos sistemas azúcar-amino ácidos (Burton et al., 1962; Adhikari, 1973; Lecléré & Birlouez-Aragon, 2001). Según la bibliografía, la intensidad de fluorescencia de los productos de la RM es ampliamente utilizada como indicador de las etapas avanzadas de la misma (Lecléré y Birlouez-Aragon, 2001; Rufian-Henares et al., 2002; Matiacevich & Buera, 2006), y es considerada como índice del grado de modificación de las proteínas.

Las longitudes de onda correspondientes a los máximos de excitación y de emisión de estos compuestos formados durante la reacción de Maillard son claramente distinguibles de la fluorescencia del aminoácido triptófano presente en las proteínas (el cual posee fluorescencia intrínseca) que tiene una longitud de onda de excitación y de emisión de 280-295 y 331-340 nm, respectivamente.

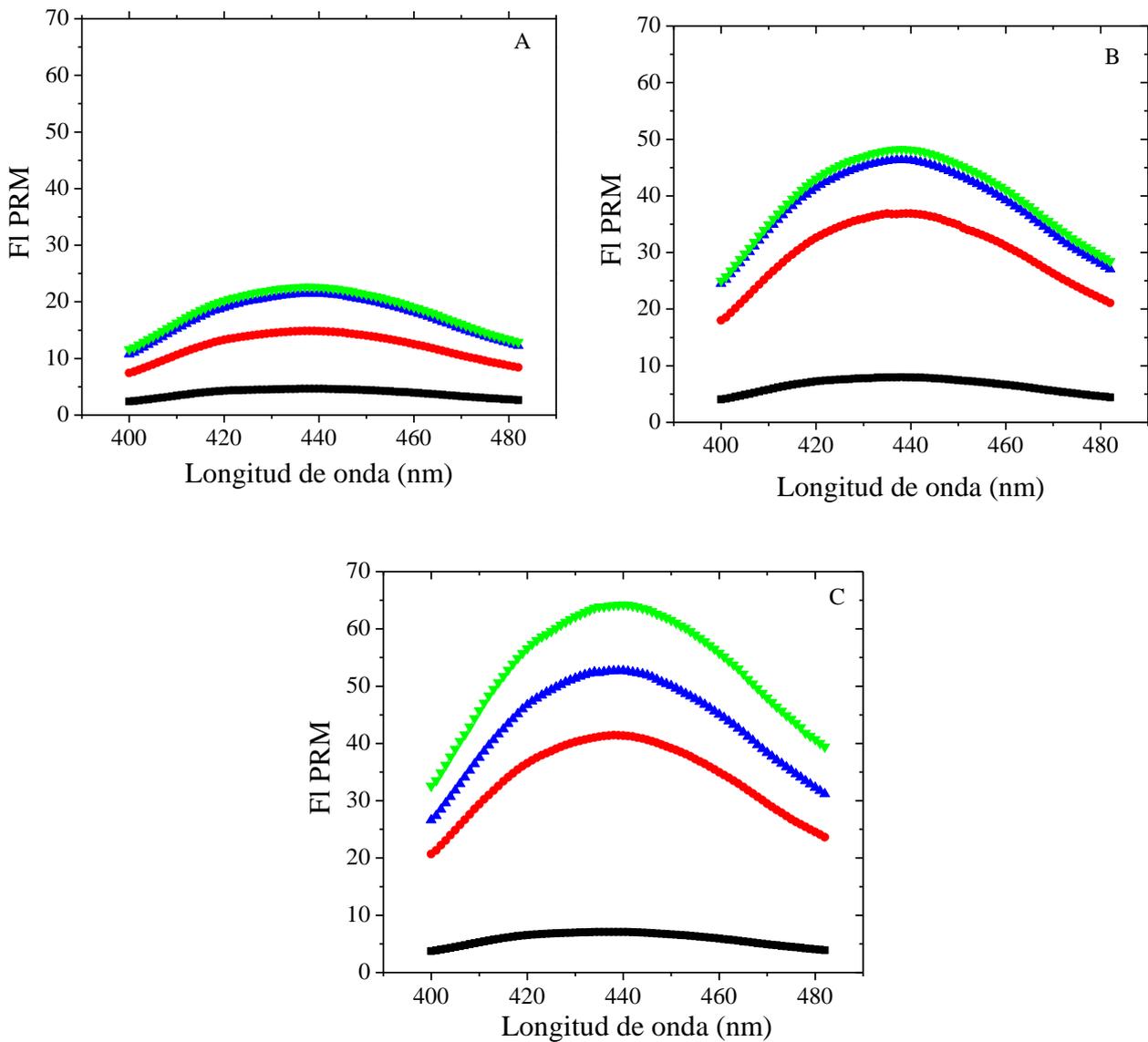


Figura 4.7. Fluorescencia de productos de reacción de Maillard ($\lambda_{ex} = 365$ nm) de sistemas WPI (■) y WPI con 0,15% p/p de DX, (●), WPI con 0,30 % p/p de DX (▲) y WPI con 0,45 % p/p de DX (▼) incubados 2 (A), 5 (B) y 9 (C) días.

Overby & Frost (1951) sugirieron que los compuestos fluorescentes pueden ser precursores de los coloreados, mientras que Matiacevich & Buera (2006) postularon que los los compuestos fluorescentes pueden ser o no precursores de los coloreados, según el tipo de

sistema en estudio. Si se compara la **Figura 4.5 C** (Absorbancia a 420 nm) con la **Figura 4.7**, se puede observar que hay una correlación entre la formación de compuestos fluorescentes y la formación de compuestos coloreados.

4.1.7. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) (sistemas conjugados DX 15-25 kDa)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica de referencia en el estudio de la desnaturalización térmica de proteínas, entre ellas la β -lg y otras proteínas globulares (Relkin, 1996; Baeza & Pilosof, 2002; Broersen et al., 2007).

En esta sección se analizaron mediante DSC los siguientes sistemas:

- WPI no incubado al 12 % p/p
- WPI incubado 2, 5 y 9 días al 12% p/p
- WPI al 12% p/p y DX 15-25 kDa al 7,2 % p/p incubado 2 y 5 días

Se eligió la concentración de DX central (7,2 % p/p) para obtener un comportamiento representativo de la incubación a los distintos tiempos de reacción.

En la **Figura 4.8**, se puede observar los termogramas de los sistemas WPI no incubado, e incubado 2, 5 y 9 días. En la curva del termograma correspondiente al WPI no incubado se puede observar una gran transición endotérmica, mientras que a los 2, 5 y 9 días de incubación esta transición es mucho menor.

Los valores de los parámetros térmicos correspondientes a la **Figura 4.8** se encuentran en la **Tabla 4.2**. Los parámetros obtenidos para el WPI no incubado ($T_o = 64,87$ °C, $T_p = 73,29$ °C, y $\Delta H = 5,20$ J/g_{prot}) son similares a los de bibliografía, ya que todos los estudios de desnaturalización térmica de la β -lg (principal proteína del WPI) mediante DSC mostraron una transición térmica en el rango de temperatura 53-85°C a pH < 9, con las menores temperaturas de transición a altos pHs (de Wit & Klarenbeek, 1984; Paulsson, Hegg, & Castberg, 1985; Mulvihill & Donovan, 1987; Stading & Hermansson, 1990). Los parámetros

térmicos del WPI son un poco menores a los obtenidos por Baeza & Pilosof (2002) para la β -lg en condiciones equivalentes de pH y velocidad de calentamiento ($T_o = 69,7$, $T_p = 76,8$ y $\Delta H = 6,76$ J/g). Esto puede ser debido a que en el WPI no hay solamente β -lg, y la α -lc tiene una temperatura de desnaturalización de 61°C según Boye et al. (1997).

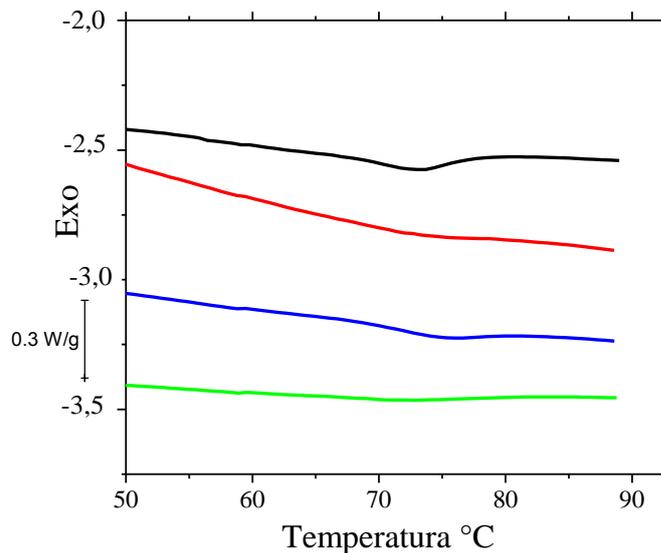


Figura 4.8. DSC de WPI al 12% no incubado (—), WPI incubado 2 (—), 5 (—) y 9 días (—).

Para los sistemas incubados, hay un aumento de T_o y T_p , tanto para el WPI incubado 2, 5 y 9 días, como para los sistemas WPI/DX con respecto al WPI no incubado, siendo mayor para estos últimos. Según Baeza & Pilosof (2002), un aumento en la T_o significa un aumento en la estabilidad térmica.

El valor de la entalpía de desnaturalización (ΔH) de los WPI disminuye con el tiempo de incubación a 60°C . Para los sistemas WPI/DX conjugados 2 y 5 días, los valores de ΔH son similares a los de WPI incubados correspondientes. Estos resultados indicarían que la incubación a 60°C produjo algún grado de desnaturalización parcial, tanto en los sistemas de WPI sin DX como en los sistemas WPI/DX.

Tabla 4.2. Parámetros obtenidos de las curvas de DSC.

| | Días de incubación | ΔH^* J/g _{prot} | T_o^* °C | T_p^* °C | T_e^* °C |
|--------|--------------------|-------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| WPI | 0 | 5,20 ± 0,11 | 64,87 ± 2,93 | 73,29 ± 0,35 | 79,64 ± 1,85 |
| | 2 | 2,00 ± 0,12 | 66,08 ± 0,40 | 72,60 ± 0,49 | 76,14 ± 2,74 |
| | 5 | 1,79 ± 0,06 | 69,62 ± 0,37 | 74,77 ± 0,17 | 79,25 ± 0,06 |
| | 9 | 1,29 ± 0,18 | 65,54 ± 1,33 | 70,98 ± 1,48 | 78,60 ± 0,14 |
| WPI/DX | 2 | 2,25 ± 0,12 | 69,05 ± 0,18 | 75,75 ± 0,21 | 82,14 ± 0,61 |
| | 5 | 1,08 ± 0,12 | 70,66 ± 0,17 | 77,40 ± 0,90 | 83,78 ± 0,53 |

**promedio ± desviación estándar de dos repeticiones.*

4.1.8. Reología Dinámica Oscilatoria (sistemas conjugados DX 15-25 kDa)

En esta sección se estudió la dinámica de gelificación de los siguientes sistemas:

- WPI no incubado al 12 % p/p
- WPI incubado 2, 5 y 9 días al 12% p/p
- WPI al 12% p/p y DX 15-25 kDa al 7,2 % p/p no incubado (mixto)
- WPI al 12% p/p y DX 15-25 kDa al 7,2 % p/p incubado 2, 5 y 9 días

Se eligió la concentración de DX central (7,2 % p/p) para obtener un comportamiento representativo de la incubación a los distintos tiempos de reacción.

Los reogramas obtenidos mediante reología oscilatoria con rampa de calentamiento se pueden observar en la **Figura 4.9 y 4.10**. Los cambios en los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') fueron medidos en función del tiempo y la temperatura durante el ciclo de calentamiento y enfriamiento. A modo comparativo se graficó solamente la evolución del módulo G' con respecto al tiempo y la temperatura de sistemas WPI y WPI/DX en la **Figura 4.11 A y B**, respectivamente.

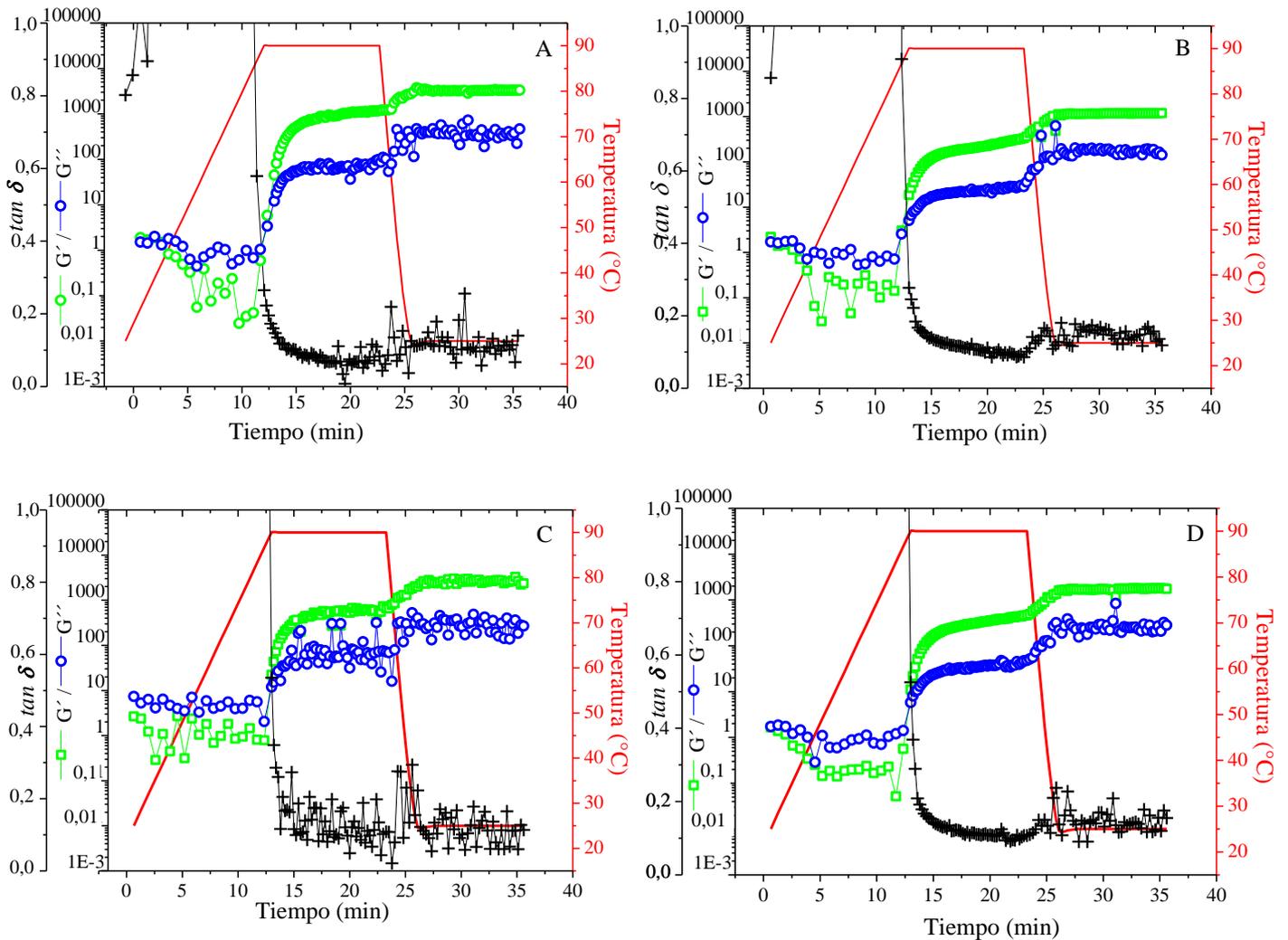


Figura 4.9. Evolución de G' (\square), G'' (\circ) y $\tan \delta$ (+) durante la gelificación inducida por calor de: una solución de WPI al 12 % p/p (A) y soluciones de WPI al 12% previamente incubadas 2 días (B), 5 días (C) y 9 días (D). En todos los casos también se indica el perfil de temperatura (-).

La **Figura 4.9 A** muestra el desarrollo de G' y G'' en función del tiempo y la temperatura para el sistema de WPI no incubado, el cual es similar a la gelificación inducida por calor de la mayoría de las proteínas globulares. Ambos valores de G' y G'' comenzaron a aumentar con el aumento de temperatura. Cuando la temperatura superó la temperatura de

desnaturalización (según DSC el perfil de desnaturalización del WPI tuvo un hombro cerca de 65°C (α -lc) y un pico cerca de 73°C (β -Lg)), se puede observar que se necesitaba más tiempo para que la desnaturalización de las proteínas procediera lo suficiente como para afectar a G' y G'' . A los 12 minutos aproximadamente y a una temperatura de 84,5°C, el valor de G' superó a G'' al final de la rampa de calentamiento, lo que indicó el comienzo de la formación de la red del gel (Verheul et al., 1999). Luego G' siguió aumentando. Este aumento luego que se inicia la gelificación es debido a que más moléculas se agregan a la red del gel, lo que lleva a una consolidación de la misma. Durante la etapa de temperatura constante a 90°C durante 10 minutos, el gel de WPI se fortaleció aún más a medida que más y más moléculas de proteínas se agregaban y por lo tanto se mejoró ampliamente la elasticidad del gel formado. El aumento de la G' prosiguió y llegó a 3000 Pa con la disminución de la temperatura de 90 °C a 25°C. Este fenómeno reveló que la red se reforzó progresivamente en el enfriamiento, lo que puede ser causado por la formación de nuevas interacciones no covalentes entre las proteínas desnaturalizadas (es decir, los puentes de hidrógeno intermoleculares en la estructura de gel) (Martinez, 2010). Renkema & van Vliet (2002) también observaron un aumento significativo en G' cuando se producía un enfriamiento de un sistema proteína de soja a pH 7, cuando se disminuyó la temperatura de 90 a 25°C, debido que hay una disminución del movimiento de las proteínas con la disminución de la temperatura, lo que permite aumentar la formación de enlaces entre las moléculas de proteínas. Durante el siguiente período de estabilización a 25 °C, no se observó un aumento significativo en G' . El módulo de pérdida G'' experimentó un curso similar en función del tiempo, pero mantuvo sus valores mucho más bajos que G' , lo que indica claramente que se formó un gel elástico. El perfil de las curvas de G' y G'' para el WPI incubado 2, 5 y 9 días se vio afectado ligeramente en comparación con la de WPI no incubado al 12% (**Figura 4.9 B, C y D**, respectivamente), aunque los valores del módulo G'

alcanzados fueron más bajos (ver **Tabla 4.3**), y el punto de cruce se produjo a tiempos más largos.

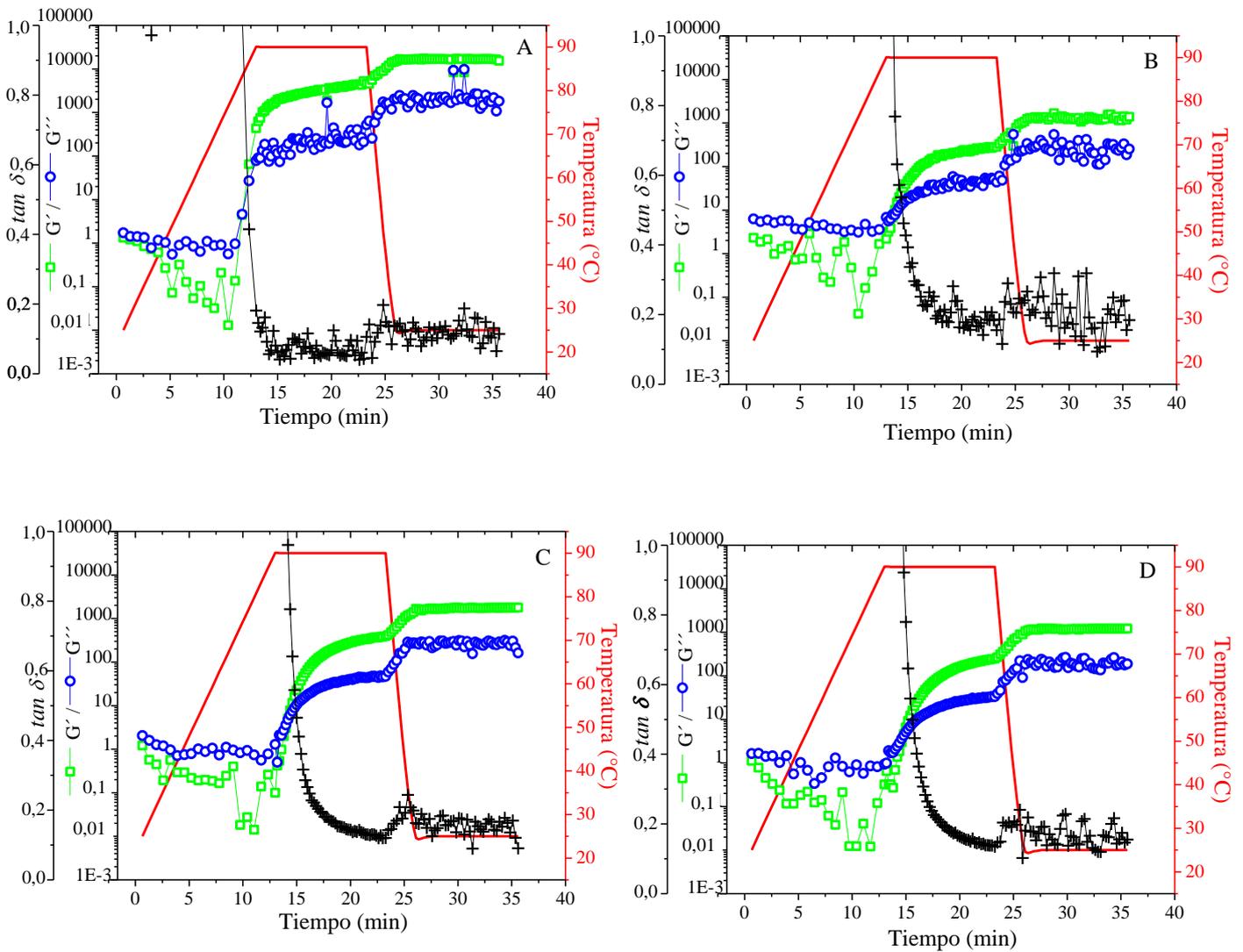


Figura 4.10. Evolución de G' (\square), G'' (\circ) y $\tan \delta$ (+) durante la gelificación inducida por calor de: solución WPI/DX (15-25 kDa) (DX al 7,2% p/p) mixta (A) y conjugadas 2 (B), 5 (C), y 9 días (D). En todos los casos también se indica el perfil de temperatura (—).

Se obtuvieron dos casos opuestos para los sistemas WPI/DX (**Figura 4.10**). Por un lado, para el sistema mixto WPI/DX 15-25 kDa (es decir, el sistema WPI/DX no incubado)

(Figura 4.10 A), los valores de G' y G'' fueron más altos y el cruce de G' y G'' se produjo a un tiempo menor que para el WPI no incubado. Por otro lado, en el caso de los sistemas conjugados WPI/DX 15-25 kDa (Figura 4.10 B, C y D, respectivamente), ambas curvas de G' y G'' se trasladaron a valores más bajos que las del WPI no incubado. Estas diferencias se observan mejor en la Figura 4.11 B. En estos sistemas conjugados, el cruce de G' y G'' se dio a valores más altos de tiempo, estando en la parte constante de la rampa de temperatura (90°C).

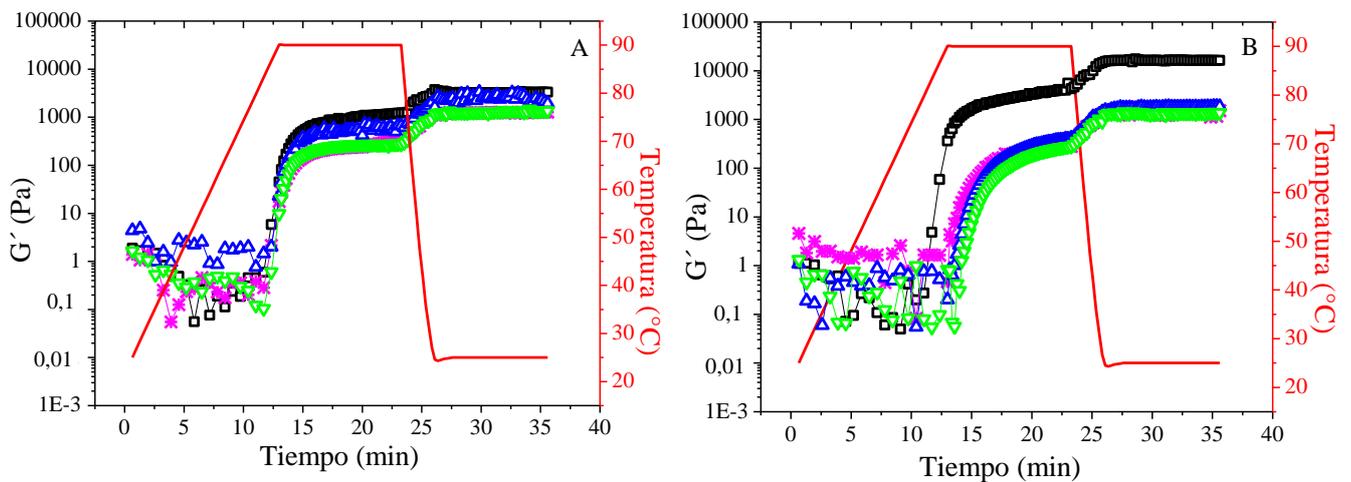


Figura 4.11. Evolución de G' durante la gelificación inducida por calor de soluciones de WPI al 12% a distintos días de incubación (A) y de soluciones WPI/DX con 7,2% p/p de DX a distintos días de incubación (B). En ambos casos: (■) 0, (★) 2, 5 (▲) y 9 días (▼); y (—) perfil de temperatura.

Los valores de G' a los cuales llegaron todos los sistemas (25°C) y los valores de $\tan \delta$, así como el tiempo (t_{gel}) y la temperatura (T_{gel}) del punto de cruce de G' y G'' obtenidos de las Figuras 4.9 y 4.10, se observan en la **Tabla 4.3**.

Tabla 4.3. Parámetros obtenidos de los reogramas de sistemas de WPI al 12% p/p con y sin agregado de DX (7,2 % p/p) según los días de incubación: G' a 25 °C, $\tan \delta$ a 25 °C, tiempo y temperatura de gelificación.

| Días de Glicosilación | DX (%p/p) | G' a 25 °C | $\tan \delta$ a 25 °C | t gel (min) | T gel (°C) |
|-----------------------|-----------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 0 días | 0 | 3220 ± 88 ^a | 0,119 ± 0,009 ^a | 12,0 ± 0,0 ^{ab} | 85 ± 0,0 ^a |
| | 7,2 | 16500 ± 200 ^c | 0,111 ± 0,005 ^a | 11,7 ± 0,3 ^a | 83,3 ± 1,7 ^a |
| 2 días | 0 | 1185 ± 86 ^b | 0,143 ± 0,011 ^{ab} | 12,3 ± 0,3 ^{bc} | 88,4 ± 0,0 ^b |
| | 7,2 | 1281 ± 44 ^b | 0,204 ± 0,035 ^c | 13,7 ± 0,0 ^d | 90,0* ± 0,0 ^b |
| 5 días | 0 | 2634 ± 478 ^a | 0,118 ± 0,009 ^a | 12,7 ± 0,0 ^c | 88,4 ± 0,0 ^b |
| | 7,2 | 1781 ± 61 ^b | 0,129 ± 0,001 ^{ab} | 14,2 ± 0,1 ^d | 90,0* ± 0,0 ^b |
| 9 días | 0 | 1775 ± 430 ^b | 0,141 ± 0,002 ^{ab} | 12,7 ± 0,0 ^c | 88,4 ± 0,0 ^b |
| | 7,2 | 1213 ± 148 ^b | 0,165 ± 0,007 ^{bc} | 14,8 ± 0,1 ^e | 90,0* ± 0,0 ^b |

Los valores con las mismas letras no arrojaron diferencias significativas al aplicar la prueba de Duncan con $\alpha = 0,05$. *Temperatura y tiempo obtenidos en la parte isotérmica de la curva.

El valor de G' a 25°C para el WPI no incubado es mayor a los obtenidos para los WPI incubados a los distintos días. En el caso del sistema mixto WPI/DX se pudo observar que el valor de G' alcanzado es mucho mayor que el del WPI no incubado, siendo el valor más alto de todos los sistemas. Estos resultados estarían indicando que la presencia de DX refuerza la red del gel, es decir que la adición de dextrano en una alta concentración aumenta el comportamiento de gelificación de la solución de proteína. Resultados similares fueron encontrados por Tavares et al. (2005) en sistemas mixtos de WPI con galactomananos (polisacáridos neutros).

Por otro lado, para los sistemas WPI/DX incubados el G' disminuyó con respecto a los sistemas no incubados. Resultados similares fueron obtenidos por Sun et al. (2011), trabajando con WPI y un dextrano de 150 kDa. Ellos estudiaron la reología de un sistema mixto WPI/DX en relación molar 1:1 (12% p/p WPI) y un sistema conjugado en las mismas condiciones. En este estudio, tanto el sistema mixto como el conjugado tuvieron valores de G' menores al WPI control (WPI no incubado). Según estos autores, la disminución en los valores de G' puede ser debida a un cambio en la cinética de las reacciones de agregación, lo cual altera intrínsecamente el mecanismo de gelificación en el conjugado WPI/DX. Otra hipótesis de estos autores es que las interacciones hidrofóbicas, las cuales juegan un rol importante en la agregación térmica y gelificación de soluciones de proteínas globulares, podrían estar afectadas. Dado que una parte voluminosa del polisacárido es hidrofílica, las interacciones entre los aminoácidos hidrofóbicos podrían estar debilitadas, lo que podría suprimir la formación de agregados entre las moléculas de proteína. Por lo tanto, la agregación inducida por el calor del WPI podría verse inhibida debido a la reducción de la hidrofobicidad, y este cambio secuencial obstaculizaría la consolidación de la red de gelificación basada en la coalescencia atractiva entre más moléculas de proteína (Le Bon, Nicolai & Durand, 1999; Xu, Yang, Yu, Qi, Guo, Sun, Yao & Zhao, 2010). Sin embargo, en nuestro estudio pudimos comprobar que el sistema mixto WPI/DX presentó un valor de G' mucho más alto que los conjugados, por lo que la parte hidrofílica de esta molécula no intervendría en la formación del gel. Esto podría deberse a la diferencia en el peso molecular de los dextranos, ya que ellos trabajaron con un DX de 150 kDa, un valor 10 veces mayor al peso molecular del DX utilizado en estos ensayos.

En cuanto a la $\tan \delta$ (que da idea de la viscosidad relativa) (**Tabla 4.3**) se observa que para los sistemas WPI/DX conjugados (incubados), la $\tan \delta$ es mayor a la del mismo sistema sin conjugar (WPI/DX mixto) y a la de los sistemas de WPI a los mismos días de incubación.

Según Avanza, Puppo & Añón (2005) un sistema con una $\tan \delta > 0,6$ se relaciona con un comportamiento de gel débil, mientras que una $\tan \delta < 0,15$ indica un comportamiento de gel elástico. Según estos valores podemos ver que todos los sistemas son geles verdaderos, teniendo $\tan \delta$ cercanas a 0,15, siendo en general más altas para los sistemas WPI/DX incubados.

De los valores de tiempo (t_{gel}) y temperatura (T_{gel}) de gelificación obtenidos a partir de los reogramas se observa que, a medida que aumentan los días de incubación, tanto el tiempo como la temperatura a la cual se lleva a cabo la formación del gel aumentan. Esto podría ser debido a que estos sistemas se encuentran parcialmente desnaturalizados, como se observó en los termogramas de DSC, por lo que tal vez sería más difícil la agregación de las moléculas proteicas, porque las mismas ya se encontrarían parcialmente agregadas, y los grupos sulfhidrilos no estarían disponibles para interaccionar libremente.

El aumento en el tiempo de gelificación se ve intensificado cuando el sistema está compuesto por WPI y DX, coincidiendo con que en estos sistemas hay un avance importante de la reacción de glicosilación en relación a los sistemas de WPI sin DX (Sección 4.1.2 a 4.1.5). Esto daría un indicio de que el aumento de los productos de reacción en el medio retarda la formación del gel. Este fenómeno podría estar relacionado con la elevación de la temperatura de desnaturalización de las proteínas como resultado de la unión de dextrano (Zhu et al., 2008; Xu et al., 2010).

Los resultados obtenidos mediante DSC indican que la T_o , T_p y T_e de los conjugados WPI/DX a 2 y 5 días de reacción fueron más altas que para los WPI incubados 2 y 5 días, por lo que esto podría ser una razón para el proceso de gelificación se retarde y se lleve a cabo a mayores temperaturas. Si tenemos en cuenta los termogramas obtenidos mediante DSC, podemos inferir que la proteína a los 2 días de incubación se encuentra parcialmente

desnaturalizada, por lo que seguramente ya se hayan formado ciertos agregados antes de la primera etapa de calentamiento.

Para el sistema mixto WPI/DX la Temperatura de gel (T_{gel}) fue la más baja de todas, siendo 83.3 °C (**Tabla 4.3**). Esto podría deberse a que la adición de un polisacárido no gelificante, como el dextrano, a soluciones de proteínas globulares bajo condiciones de limitada incompatibilidad termodinámica aumenta la velocidad de gelificación (Capron et al., 1999; Baeza & Pilosof, 2001).

Por otro lado, todos los valores de T_{gel} se situaron por encima de las temperaturas de desnaturalización de los sistemas (obtenidas mediante DSC), siendo la T_o obtenida por DSC de 64-70°C. Esta diferencia puede ser debida a la diferencia de velocidad de calentamiento en DSC y en reología, ya que en DSC la velocidad de calentamiento fue de 10°C/min, mientras que en reología de 5°C/min.

4.1.8.1. Espectros mecánicos (sistemas conjugados DX 15-25 kDa)

A fin de estudiar la influencia de la frecuencia de oscilación en el gel formado, se realizaron barridos de frecuencia desde 0,1 a 10 Hz después del período de mantención a 25°C. En la **Figura 4.12** se pueden observar los espectros mecánicos del WPI no incubado, como de los WPI incubados 2, 5 y 9 días, y en la **Figura 4.13** los de sistemas WPI mixtos y conjugados 2, 5 y 9 días.

En comparación con el espectro correspondiente al WPI no incubado (**Figura 4.12 A**), los espectros de WPI incubados 2, 5 y 9 días mostraron valores de G' más bajos (**Figura 4.12 B, C y D**). Por otra parte, el sistema mixto WPI/DX15-25 incubado (**Figura 4.13 A**) presentó valores de G' más altos que los sistemas WPI/DX15-25 conjugados (**Figura 4.13 B, C y D**).

Los espectros mecánicos de todas las muestras fueron característicos de geles elásticos con $G' > G''$. Como se puede ver en las **Figuras 4.12 y 4.13**, los valores de G' de los geles

mostraron poca dependencia sobre todo el rango de frecuencias, aumentando levemente con el incremento de la frecuencia.

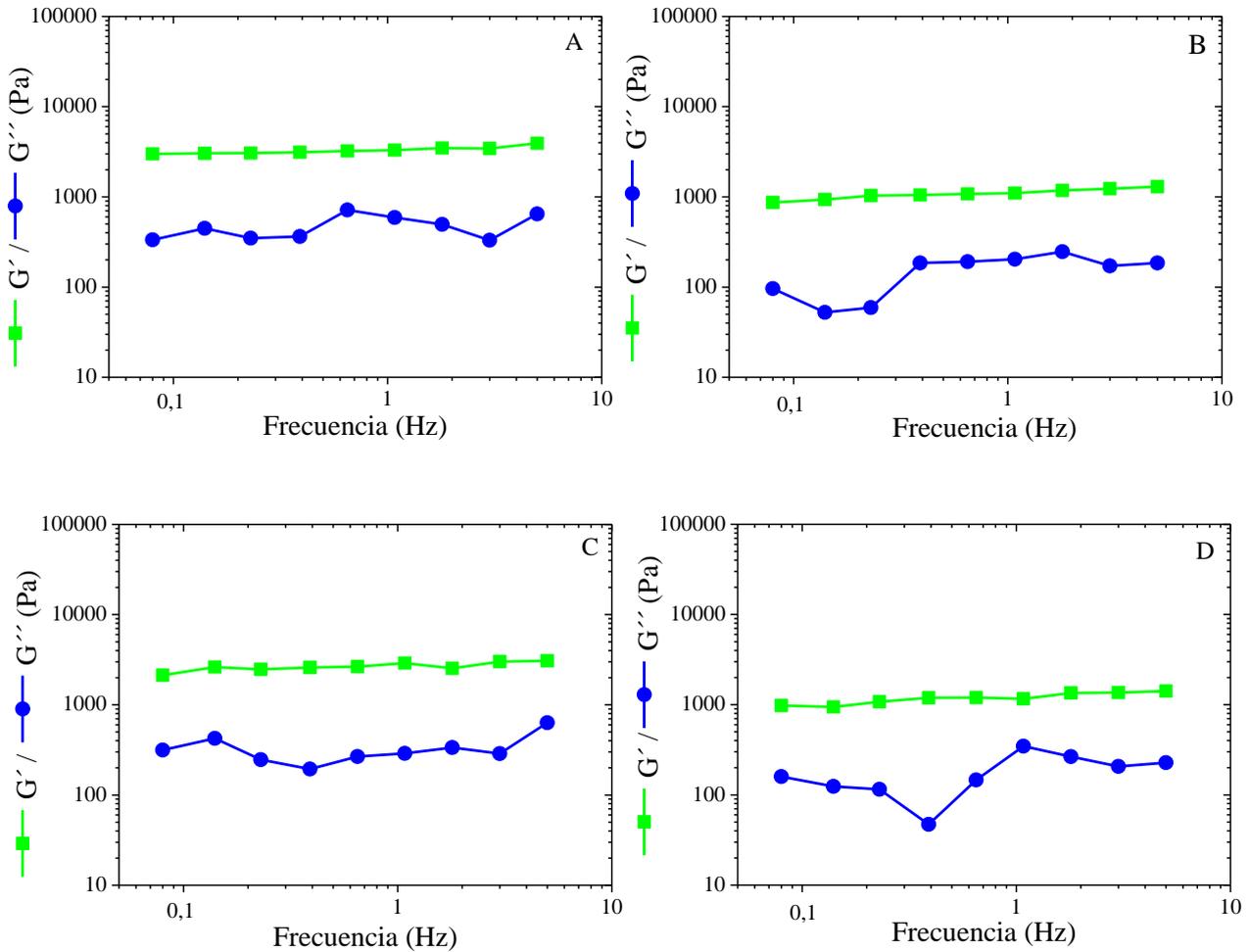


Figura 4.12. Espectro mecánico (barrido de frecuencia) de geles de WPI (12% p/p) no incubado (A) y previamente incubado 2 (B), 5 (C) y 9 (D) días.

Según Stading & Hermansson (1990) un gel covalente es independiente de la frecuencia, mientras que un gel físico es sutilmente dependiente de la frecuencia. Así, la dependencia de G' con la frecuencia es un parámetro característico del tipo de gel.

Renkema & van Vliet (2002) encontraron que geles obtenidos de aislado de proteína de soja a pH 7 fueron muy dependientes de la frecuencia aplicada, mostrando que los geles tienen un comportamiento viscoso a escalas de tiempo más largas, indicando que los enlaces proteína-proteína son cortos en vida media. En el caso de los sistemas estudiados aquí, vemos que los enlaces que forman el gel no son cortos en vida media, indicando que son del tipo covalente (puentes disulfuro entre residuos de cisteína).

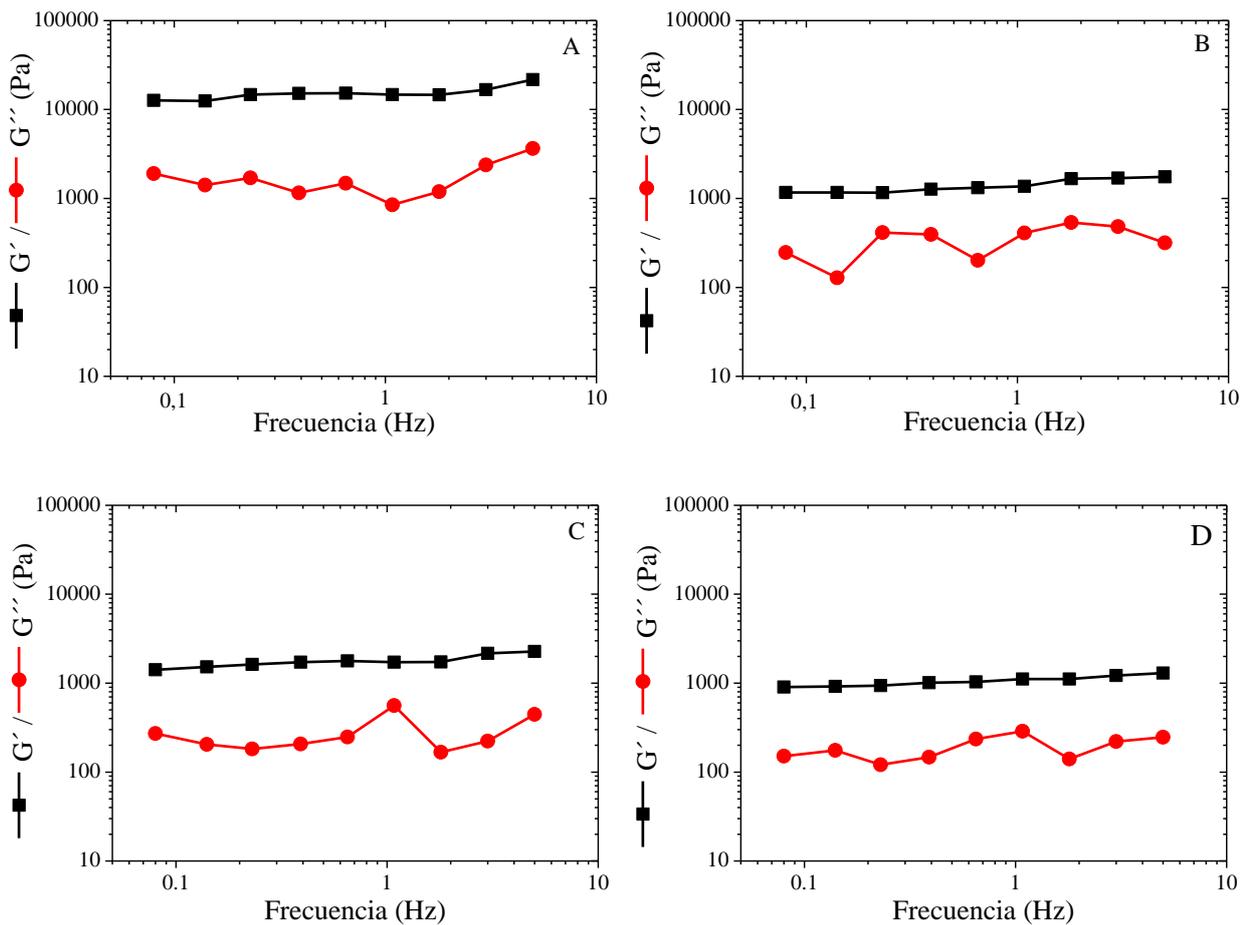


Figura 4.13. Espectro mecánico (barrido de frecuencia) de geles WPI/DX mixto (A) e incubado 2 (B), 5 (C) y 9 (D) días. La concentración de WPI es del 12 % p/p y la DX del 7,2 % p/p.

A partir de la Ec. 4 definida en **Materiales y Métodos** se determinó la constante n (Stading & Hermansson, 1992). El valor de n se considera un indicador de la naturaleza viscoelástica de los geles: este valor es cero en geles puramente elásticos y es más alto con el incremento de la contribución de la componente viscosa (menos elástico) (Ikeda & Foegeding, 1999), o definido de otra manera por Clark & Ross-Murphy, $n = 0$ para geles covalentes y $n > 0$ para geles físicos. En la **Figura 4.14** se muestran los valores de n obtenidos para los sistemas WPI y WPI/DX no incubados como incubados 2, 5 y 9 días.

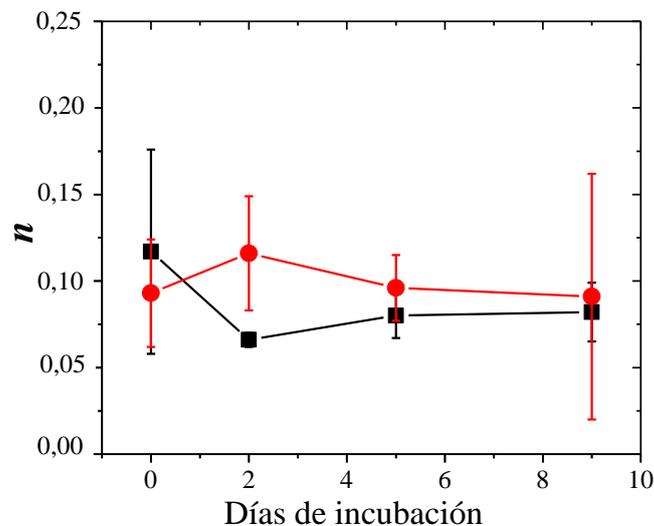


Figura 4.14. Valor de n para sistemas WPI (■) y WPI/DX (15-25 kDa) (●) a distintos días de incubación. Los sistemas WPI y WPI/DX a 0 días, son WPI no incubado y WPI/DX mixto, respectivamente.

Los valores de n obtenidos indican la predominancia de la naturaleza elástica de los geles dando valores del orden de 10^{-2} y 10^{-1} , y son similares a los obtenidos por Martínez (2010) trabajando con β -lg al 15% p/p y pH 7, en un barrido de frecuencia similar al utilizado

en la presente tesis. En la gráfica se puede observar que en el primer punto correspondiente a 0 días de incubación el valor de n del sistema mixto WPI/DX tendería a ser menor que el valor de n para el WPI no incubado. Este resultado se corresponde con la menor viscoelasticidad relativa (mayor $\tan \delta$) para el sistemas WPI no incubado en comparación con el sistema WPI/DX mixto. Luego para los demás sistemas WPI/DX el valor de n pasa a ser mayor que el correspondiente WPI incubado a los mismos días, indicando un aumento de la contribución viscosa en los sistemas WPI/DX conjugados. Estos resultados indican que los geles de sistemas no incubados son más parecidos a los geles covalentes que los geles de sistemas incubados, y que la presencia de DX en los geles de sistemas incubados aumenta su similitud a los geles físicos.

4.1.9. Propiedades mecánicas de geles WPI/DX

4.1.9.1. Compresión uniaxial (sistemas mixtos y conjugados DX 15-25 kDa)

Para estudiar las propiedades mecánicas de los geles se realizaron ensayos de Compresión Uniaxial a los geles mixtos y conjugados mostrados en la **Figura 4.3**. El comportamiento de los geles al esfuerzo aplicado durante el ensayo se muestra en la **Figura 4.15**.

Como se puede observar, hay un comportamiento distinto entre geles mixtos y conjugados. Los geles mixtos a todas las concentraciones presentan un punto de fractura (**Figura 4.15 A**), mientras que en las mismas condiciones de ensayo, los geles conjugados no (**Figura 4.15 B, C y D**).

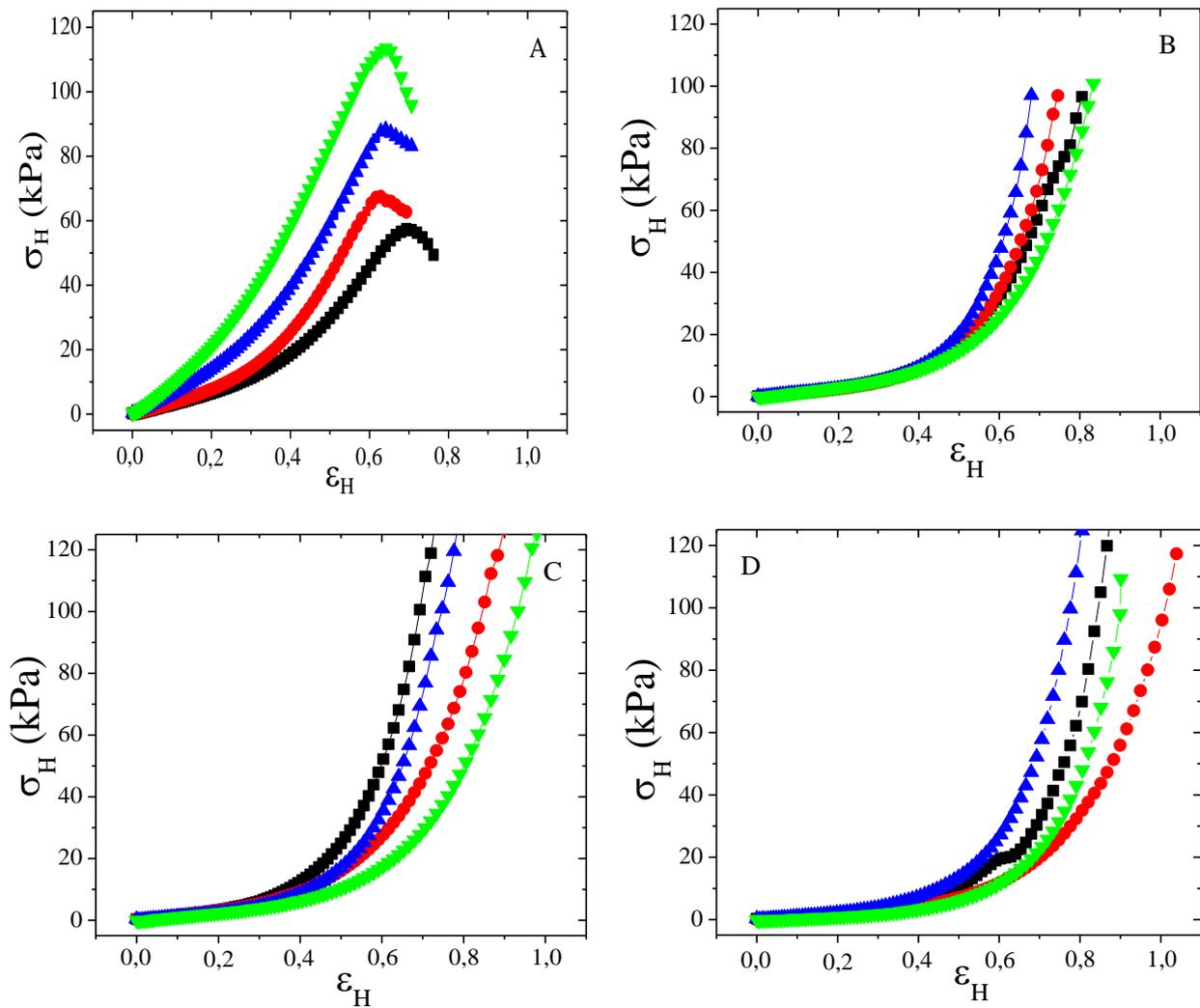


Figura 4.15. Esfuerzo (σ_H) vs. Deformación de Hencky (ϵ_H) para geles de WPI y de WPI/DX al 12 % p/p de proteínas y con DX 15-25 kDa al: 0 % p/p DX (■), 3,6% p/p (●), 7,2 % p/p (▲), y 10,8% p/p (▼), mixtos (A) e incubados 2 (B), 5 (C) y 9 días (D).

Para los geles mixtos (**Figura 4.15 A**), el esfuerzo (σ_H) aumenta con la deformación de Hencky (ϵ_H) hasta que se produce fractura, momento en el cual el esfuerzo disminuye abruptamente. Como se puede observar, la presencia de dextrano y el aumento en la concentración del mismo, incrementan el esfuerzo del gel en el punto de fractura. Este parámetro es el esfuerzo máximo a la fractura (σ_M). Este y los demás parámetros mecánicos,

calculados a partir de la gráfica σ_H vs ε_H de los geles mixtos WPI/DX, se encuentran en la

Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Parámetros mecánicos de geles mixtos WPI/DX.

| Conc DX (% p/p) | σ_M (KPa) | ε_M | W_F |
|--------------------|---------------------|-------------------|------------------|
| 0 | $58,4 \pm 6,5^a$ | $0,71 \pm 0,01^a$ | $15,6 \pm 1,4^a$ |
| 3,6 | $72,6 \pm 7,6^a$ | $0,64 \pm 0,02^a$ | $15,8 \pm 1,5^a$ |
| 7,2 | $97,5 \pm 3,6^b$ | $0,69 \pm 0,03^a$ | $27,8 \pm 1,9^b$ |
| 10,8 | $118,1 \pm 12,1^c$ | $0,65 \pm 0,01^a$ | $32,9 \pm 3,8^c$ |

Los valores con las mismas letras no arrojaron diferencias significativas al aplicar la prueba de Duncan con $\alpha = 0,05$.

El esfuerzo máximo a la fractura (σ_M), como se dijo anteriormente, aumenta a medida que aumenta la concentración de DX, sugiriendo que el polisacárido estaría reforzando la red del gel que forman las proteínas. La adición de polisacárido podría causar un acercamiento de las moléculas de proteína entre sí, probablemente actuando como material de relleno (“filler”) (Tavares & Lopes da Silva, 2003). Sin embargo, hay otras interacciones que se darían entre proteínas y polisacáridos que podrían ser consideradas en la formación de gel, tal como puentes hidrógeno y enlaces electrostáticos entre ciertos grupos del polisacárido y de las proteínas. En este caso de estudio, las interacciones electrostáticas entre WPI y dextrano se deberían subestimar porque el dextrano es un polisacárido neutro, y todas las experiencias se realizaron a pH 7 y a baja fuerza iónica. Los valores de σ_M de los sistemas WPI y WPI/DX son similares a los obtenidos en estudios previos que llevamos a cabo con WPI y galactomananos (Spotti et al., 2012) y a los obtenidos por otros autores trabajando con

concentraciones parecidas de WPI o β -lg (Errington & Foegeding, 1998, Standing & Hermansson, 1991). Resultados similares fueron reportados en otros estudios, donde trabajaron con WPI y otros polisacáridos neutros como galactomananos. Ejemplos de ellos son los trabajos, de Jong & Van de Velde (2007) y Fitzsimons et al (2008) trabajando con WPI y goma Locust Bean, goma Tara y goma Guar. El mismo comportamiento se observó también para otros polisacáridos como la goma Xántica (Li, Ould Eleya & Gunasekaran, 2006; Bertrand & Turgeon, 2007) y goma Gellana (de Jong & Van de Velde, 2007).

El trabajo a la fractura está relacionado con el σ_M , por lo que aumenta a medida que la concentración de DX es mayor. Un aumento casi lineal se encontró en estos parámetros con el incremento en la concentración, de DX, de modo que la energía total necesaria para romper el gel y la elasticidad del gel aumentó con la concentración total de macromoléculas. Estos resultados sugieren que la adición de dextrano tiene un efecto sinérgico sobre las propiedades mecánicas de geles de WPI, lo que podría explicarse teniendo en cuenta las interacciones segregativas entre estas macromoléculas. La consecuencia de la segregación de macromoléculas es un aumento de la concentración local de cada componente; este comportamiento está más pronunciado cuando el polisacárido es neutro (Tavares & Lopes da Silva, 2003; Pérez et al, 2006; Bertrand & Turgeon, 2007; Li et al, 2006).

La deformación de Hencky no presenta diferencias significativas para las distintas concentraciones de DX.

En la **Figura 4.16** se encuentra el módulo de Young de geles mixtos y conjugados. El módulo de Young de geles mixtos aumenta a medida que aumenta la concentración de DX, es decir que aumenta la firmeza de los geles. Este resultado está de acuerdo con los parámetros mecánicos a la fractura calculados en la **Tabla 4.4**.

Con respecto a los geles conjugados, el módulo de Young fue el único parámetro mecánico calculado, ya que no es calculado en el punto de fractura. Para geles conjugados, tanto la concentración de DX como los días de reacción influyen en este parámetro. A medida que la concentración de DX y los días de reacción aumentan el Módulo de Young es menor. Esto quiere decir que a mayor progreso de la reacción de Maillard, es decir, cuando hubo mayor cantidad de grupos carbonilos con posibilidad de reaccionar y cuando se aumentaron los días de reacción, se produce mayor debilitamiento de la red del gel (menor módulo de Young). Además, se puede observar en la **Figura 4.16 A y B**, que la diferencia entre los valores de módulo de Young de geles mixtos y conjugados es muy grande, ya que en geles mixtos estos van de 30 a 110 kPa aproximadamente, mientras en geles conjugados de 3 a 18 kPa.

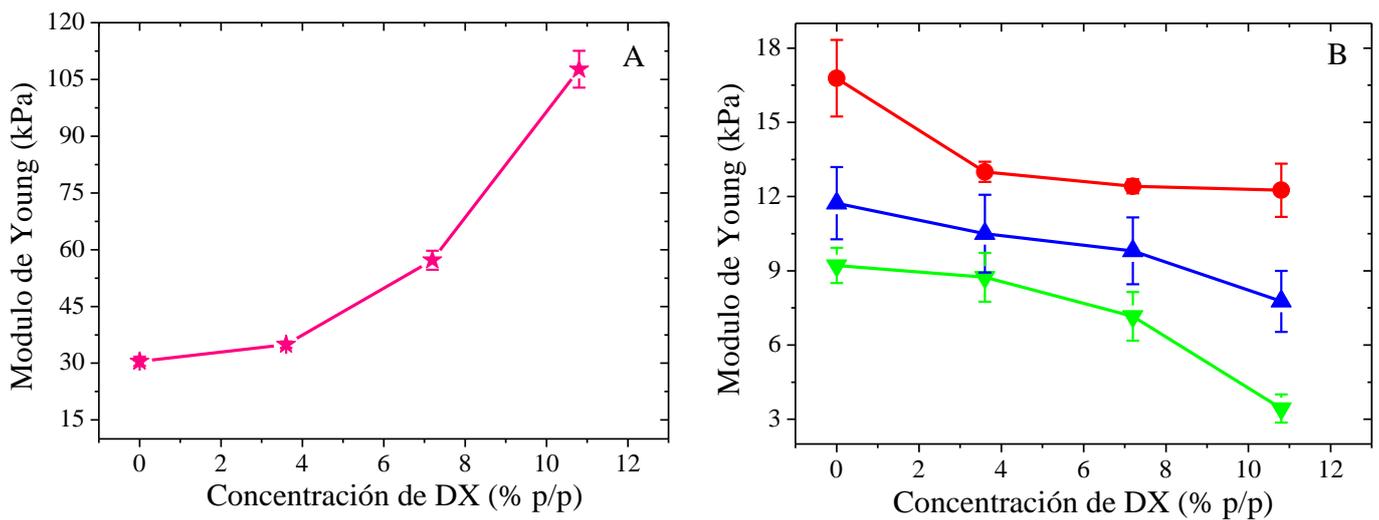


Figura 4.16. Módulo de Young para (A) geles mixtos (★) y (B) geles conjugados WPI/DX (15-25 kDa) a 2 (●), 5 (▲) y 9 (▼) días de incubación y según la concentración de DX.

Con el fin de saber por qué no se produce la fractura en geles conjugados, hay que aclarar los factores que determinan el esfuerzo y la deformación a la fractura en geles de WPI. Se considera que ocurre fractura cuando todas las uniones entre los elementos estructurales que forman la red de gel en cierto plano macroscópico se rompen, lo que conduce a un colapso de la estructura del gel sobre escalas de longitud mucho mayor que los elementos estructurales y en última instancia, ocurre un desmoronamiento del material (van Vliet, 1996). Todos los materiales son heterogéneos, ya que contienen pequeñas grietas o puntos débiles. Un material se fracturará si una de las grietas ya existentes crece a una longitud tal que el material se desintegra. Una grieta comenzará a crecer (iniciación de la fractura) si la tensión en la punta de la grieta es mayor que la adherencia o fuerza de cohesión entre los elementos estructurales. Si este es el caso, y si la cantidad diferencial de energía de deformación liberada durante el crecimiento de la grieta supera la cantidad diferencial de energía requerida, la grieta crecerá espontáneamente (propagación de la fractura) (van Vliet, 1996). Esto se observa generalmente como el punto de fractura. (Van Vliet, 1996).

A pH 7, los geles de WPI inducidos por calor tienen un comportamiento fuerte y elástico cuando se comprimen debido a su microestructura de cadena fina (Stading & Hermansson, 1991; Errigton & Foegeding, 1998), lo que le dan a estos geles altos valores de deformación y esfuerzo a la fractura. La combinación de enlaces covalentes, generalmente atribuidos a los enlaces disulfuro, y las interacciones intermoleculares no covalentes, proporcionados por puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, entre las moléculas de proteínas globulares proporcionan una contribución muy importante a la reología de los geles proteicos y tienen un impacto significativo sobre las propiedades finales del gel. En este tipo de geles, los puentes disulfuro no son esenciales para la formación de los geles inducidos por calor pero contribuyen en gran medida a las propiedades de textura. Según Errigton & Foegeding (1998), cuando el enlace disulfuro es inhibido por la adición de

un agente reductor de grupos sulfhidrilos, los geles de proteína de suero a pH 7,0 son quebradizos. Los geles de WPI cambian su textura de quebradizo a elástico mediante el aumento de la cantidad de enlaces disulfuro.

En geles conjugados, además de puentes disulfuro e interacciones no covalentes, hay enlaces covalentes entre grupos amino de las proteínas y carbonilo del DX, y están presentes productos de la MR, siendo algunos de ellos polímeros derivados de la RM. Tal vez todo este conjunto de enlaces covalentes y no covalentes son responsables de mantener unida la estructura de gel y así prevenir la fractura.

Ninguno de los geles conjugados presentó fractura, pero todos ellos son débiles en comparación con los geles mixtos, como se demostró mediante el módulo de Young y los valores de G' obtenidos por reología oscilatoria. Muchos factores podrían promover el debilitamiento de la red del gel en geles conjugados. La pérdida de la estructura secundaria de la proteína, ya sea por incubación (5 días a 60 ° C) o por la unión DX podría ser uno de ellos. Debido a la pérdida parcial de la estructura secundaria, los grupos sulfhidrilos de las principales proteínas constituyentes del suero (β -lg y α -lc) no estarían totalmente disponible para interactuar de forma covalente unos con otros para formar enlaces disulfuro. Otra explicación del debilitamiento del gel conjugado puede ser que los polímeros resultantes en las etapas finales de la reacción de Maillard podrían alterar la formación de la red de gel. Esta alteración podría ser debida a un impedimento estérico, donde las interacciones hidrofóbicas que son muy importantes en la estructura de gel, se verían obstaculizadas, o los grupos sulfhidrilos serían incapaces de generar enlaces disulfuro inter e intracatenarios. De todos modos, el hecho de que cuanto mayor es la extensión de la reacción, mayor es el debilitamiento de la red del gel, no está completamente aclarado.

Otro aspecto a considerar es que la liberación de suero también podría influir en gran medida en las propiedades de deformación a la fractura de los geles; por lo tanto es

importante remarcar que ni los geles mixtos ni los conjugados mostraron sinéresis cuando se sometieron a compresión uniaxial. La liberación de suero está claramente relacionada con la microestructura de los geles. Los geles con poros grandes o poros muy interconectados liberan cantidades significativamente mayores de suero que los geles con baja porosidad (van den Berg, van Vliet, van der Linden, van Boekel & van de Velde, 2007). En este caso ambos tipos geles, mixtos y conjugados, se corresponden con microestructuras de gel con una red densa con baja porosidad, lo que impide la liberación de suero.

4.1.9.2. Cálculo de tamaño de poro de geles WPI/DX (sistemas mixtos y conjugados DX 15-25 kDa)

En la **Figura 4.17** se puede observar el tamaño de poro de geles WPI/DX mixtos y conjugados a distintos días de reacción.

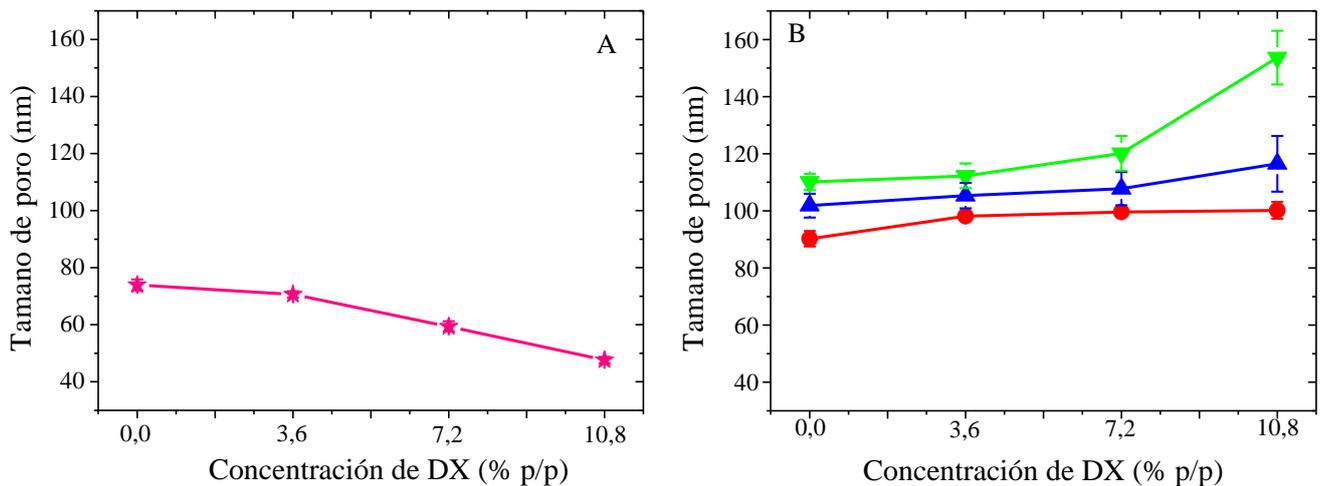


Figura 4.17. Tamaños de poros calculados mediante la teoría de elasticidad de las gomas. (A) geles WPI/DX (15-25 kDa) mixtos (★) y (B) conjugados a 2 (●), 5 (▲) y 9 (▼) días de incubación, según la concentración de DX.

El tamaño de poro de geles mixtos WPI/DX 15-25 kDa (**Figura 4.17 A**) disminuye a medida que aumenta la concentración de DX adicionada. Esto está de acuerdo con lo discutido en la Sección 4.1.7, teniendo como hipótesis que es muy probable que ocurra una segregación de fases, dado que el dextrano es un polisacárido neutro y que podría actuar como un relleno incrementando la concentración local de proteínas y por lo tanto disminuyendo el tamaño de poro de la red continua que forma la misma.

Por el contrario, los geles conjugados presentan un tamaño de poro mayor al de los mixtos, y el tamaño de poro aumenta con la concentración de DX y los días de reacción (**Figura 4.17 B**). Esto podría deberse a que los polímeros de las etapas tardías de la reacción de Maillard podrían interferir en la formación de la red continua de proteínas y por lo tanto aumentar la porosidad del gel en relación a los mixtos.

4.1.10. Microscopía Láser Confocal de Barrido (geles mixtos y conjugados con DX 15-25 kDa)

Las imágenes de microscopía confocal de geles de WPI al 12% (**Figura 4.18 A**) como de geles de WPI al 12% incubados 2, 5 y 9 días (**Figura 4.18 B, C y D**, respectivamente) son imágenes continuas, sin interrupciones, donde no se distinguen la red de proteínas o los poros que conforman estos geles. Según la teoría de elasticidad de las gomas, los tamaños de poros de los geles estudiados va de 40 a 160 nm, mientras que la resolución máxima del microscopio es de aproximadamente 200 nm. Esto fue observado también en otro estudio de geles de WPI con similar método de obtención y concentraciones (Monteiro et al., 2005).

Las imágenes de los geles de WPI/DX mixtos (**Figura 4.18 E**) y conjugados a 2, 5 y 9 días (**Figura 4.18 F, G y H**, respectivamente) no revelaron modificación de la estructura con respecto a los geles de WPI solo, siendo imperceptible la presencia del DX.

En un estudio previo (Spotti et al., 2012), encontramos que los geles mixtos de WPI y goma espina corona (GEC), otro polisacárido neutro, a concentraciones mucho menores de polisacárido que las utilizadas en esta tesis, presentaban separación de fases cuando fueron observados por microscopía confocal. Esta separación de fases se relacionó directamente con los resultados de los ensayos de compresión uniaxial, los que revelaron aumentos en la dureza de los geles. Comparando ambos estudios podemos inferir que tal vez el peso molecular del DX (15-25 kDa), mucho menor que el peso molecular de la GEC (1390 kDa), sea la razón por la cual no haya separación de fases en estos geles. Estos resultados son similares a los encontrados por Monteiro et al. (2005) donde los galactomananos de peso molecular bajo (168 kDa) no modificaron la microestructura de geles de WPI. Sin embargo, los geles con galactomananos de mayor peso molecular (425-1930 kDa) tuvieron dos fases, una con el polisacárido y otra con proteínas, donde el tamaño de las áreas ricas en polisacárido era cada vez mayor a medida que el peso molecular del polisacárido aumentaba.

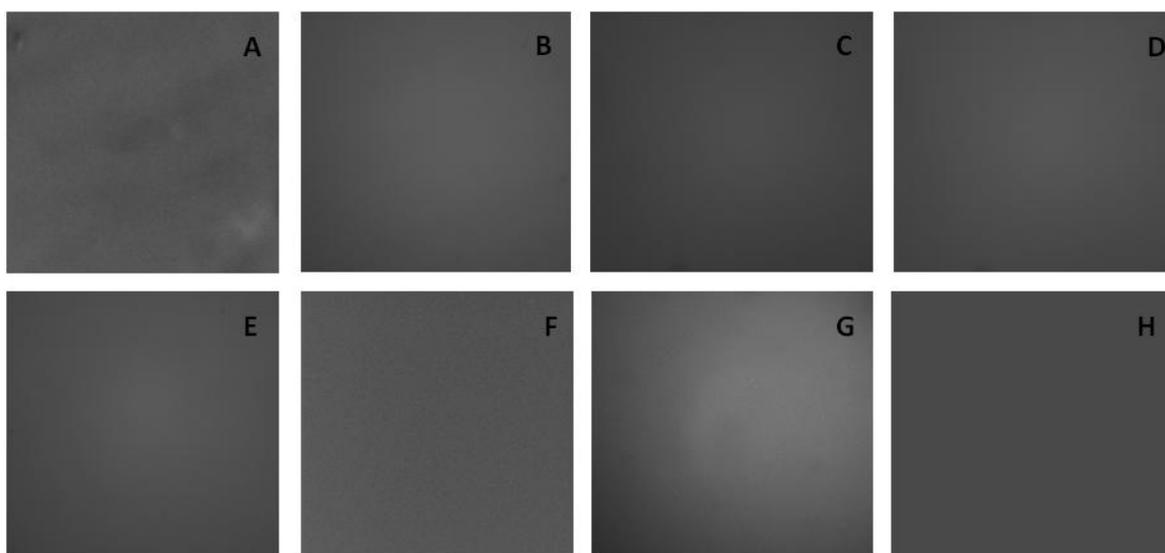


Figura 4.18. Imágenes de Microscopía Láser Confocal de Barrido de geles de WPI no incubado (A), WPI incubado 2 (B), 5 (C) y 9 (D) días; y de WPI/DX no incubados (mixto) (E) e incubados 2 (F), 5 (G) y 9 (H) días.

***4.2. Sistema WPI (6, 40 y 70 kDa): Efecto del
peso molecular del dextrano***

4.2. SISTEMA WPI/DX (6, 40 y 70 kDa): Efecto del peso molecular del dextrano

4.2.1. Electroforesis SDS-PAGE (sistemas conjugados DX 6, 40 y 70 kDa)

Los patrones del SDS-PAGE se ven en la **Figura 4.19**. En la **Figura 4.19 A** se encuentran las bandas teñidas con Coomassie Brilliant Blue para detectar proteínas y en la **Figura 4.19 B** con Fucsina básica para detectar glicoproteínas.

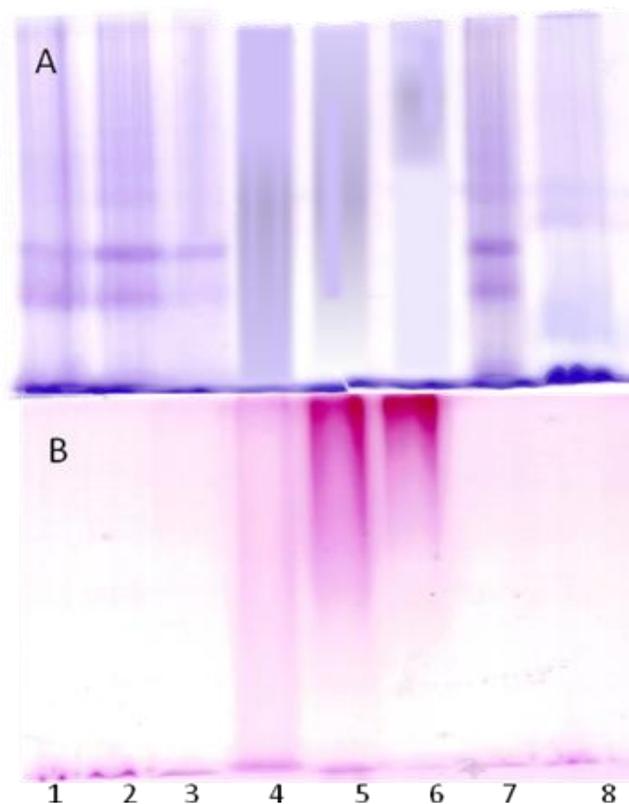


Figura 4.19. Electroforesis de conjugados WPI DX (6, 40 y 70 kDa). Calle 1: β -lg, calle 2: WPI no incubado, calle 3: WPI incubado 5 días, calle 4, 5 y 6: conjugado WPI/DX (WPI al 12% p/p y DX al 7.2% p/p) con DX de 6, 40 y 70 kDa, respectivamente, calle 7: WPI incubado 5 días, calle 8: DX de 40 kDa. (A): Marcado con Coomassie Blue (tinción de proteínas), (B): Marcado con Fucsina básica (tinción de glicoproteínas).

En la **Figura 4.19 A** se puede observar que la β -lg y el WPI nativo (calles 1 y 2) presentan bandas en la misma posición, mientras que se observaron pocos cambios en el WPI incubado 5 días (calles 3 y 7, son dos muestras distintas de WPI incubado 5 días). No obstante, las bandas características de WPI desaparecieron para los conjugados (carriles 4, 5 y 6), y aparecieron nuevas bandas que se observan como manchas dispersas a lo largo de la parte superior del gel de separación, evidenciando que se formaron compuestos de mayor peso molecular en los sistemas WPI/DX. Estos resultados son semejantes a los obtenidos en la Sección 4.1 para los conjugados de WPI con el dextrano de 15-25 kDa incubados 2, 5 y 9 días. Resultados similares fueron obtenidos por Gu, Kim, Abas, Zhang, Xia & Chen (2010). En la calle 8 no hay bandas, ya que se sembró dextrano de 40 kDa, que no se colorea con Coomassie Blue.

Por otro lado, la tinción con Fucsina básica (**Figura 4.19 B**) revela que en las calles 1, 2, 3 y 7 no hay bandas (ya que estas calles corresponden a la β -lg, WPI no incubado y WPI incubado 5 días, respectivamente) y en las calles 4, 5 y 6 hay presencia de glicoproteínas. Se puede observar que los conjugados WPI/DX6 se observan dispersos a lo largo del gel de separación, los conjugados WPI/DX40 se encuentran más arriba y los WPI/DX70 se encuentran en la parte superior del gel. Esto indicaría que los conjugados van aumentando de peso conforme aumenta el peso molecular del DX involucrado.

Si bien tampoco es posible determinar cuál es el peso molecular exacto de los compuestos conjugados, se puede concluir que la reacción fue exitosa y que los conjugados WPI/DX se han formado en todos los sistemas estudiados. En la calle 8 no se observan bandas, ya que el dextrano de 40 kDa no corrió (porque por sí mismo no tiene carga), pero se pudo observar acumulado en el punto de siembra marcado con Fucsina básica (no se observa en la figura porque el peine de siembra fue removido).

4.2.2. Determinación de grupos amino libres (sistemas conjugados DX 6, 40 y 70 kDa)

La cuantificación de los grupos amino libres nos proporciona una idea del progreso que tuvo la reacción de Maillard. Según podemos observar en la **Figura 4.20**, hay una disminución de los grupos amino libres para todos los sistemas WPI/DX en comparación con el WPI incubado 5 días (primer punto de cada serie de la **Figura 4.20**). La disminución es mayor a medida que aumenta la concentración de DX.

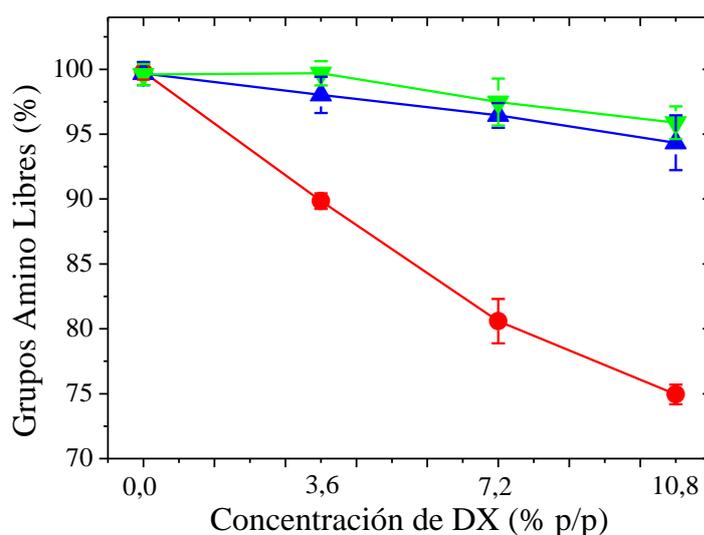


Figura 4.20. Cuantificación de Grupos Aminos Libres (GAL) de sistemas WPI/DX conjugados a 5 días de reacción con DX de 6 (●), 40 (▲) y 70 (▼) kDa. Se tomó como referencia (100% de GAL) al WPI no incubado.

Por otro lado, el peso molecular del dextrano afecta en forma significativa el contenido de grupos amino libres. De los tres PM estudiados, el menor de ellos (6 kDa) es el que más reacciona. Esto es lógico teniendo en cuenta que a medida que menor es el tamaño del polisacárido, menor es el impedimento estérico, pudiendo acceder de manera más fácil a los grupos aminos de las proteínas. La estructura más voluminosa del dextrano de 40 y 70 kDa

puede restringir el acceso a los sitios reactivos de los grupos amino de las proteínas y viceversa. Wooster & Augustin (2007) obtuvieron desde 93% hasta 62% de grupos amino libres trabajando con conjugados de WPI y dextranos de 5,9, 29,4 y 42,4 kDa incubados 5 y 10 días, que son valores muy similares a los obtenidos en la presente tesis.

Un aumento en la concentración de DX desde 3,6 a 10,8 % p/p en los sistemas con dextranos de 40 y 70 kDa no resulta en una disminución significativa de los grupos amino libres. Resultados similares fueron encontrados por Zhu et al. (2008).

Si bien mediante esta técnica podemos inferir que hay un grado de unión entre el WPI y los dextranos, no podemos saber con exactitud cuántas moléculas de DX se unieron por molécula de WPI. La mayoría del WPI consiste en β -lg y α -lc en una proporción molar de aproximadamente 2,7 a 1, cada una teniendo un $-NH_2$ terminal, y 15 y 12 $-NH_2$ de los grupos lisina, respectivamente (Fenaille, Morgan, Parisod, Tabet, & Gu, 2004; Lund, Losen, Sorenson, & Skibsted, 2005). Algunos trabajos tienen en cuenta estos valores para hacer un cálculo aproximado de los grupos amino ocupados (Chevalier et al., 2001, trabajando a pH 6.5; Wooster & Augustin, 2007, sin ajustar pH), pero hay que tener en cuenta, como se dijo en la Sección 4.1.2, que los grupos amino a pH 7 se encuentran en la forma protonada que no es reactiva, por lo que no estarían totalmente disponibles para interactuar con los dextranos. Por esto mismo, se necesitaría una técnica complementaria, para saber cuántas moléculas de DX se unieron por molécula de proteína. En algunos trabajos usan cromatografía de exclusión molecular (wooster & Augustin, 2007) seguida de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Gu et al., 2010).

4.2.3. Determinación de parámetros de color (sistemas conjugados DX 6, 40 y 70 kDa)

En la **Figura 4.21** se encuentran los parámetros CIE Lab a^* , b^* y L^* , y el cambio en color ΔE (calculado con estos tres últimos) para los sistemas WPI y WPI/DX incubados 5

días. Cada serie dentro de los gráficos corresponde a un dextrano de peso molecular determinado.

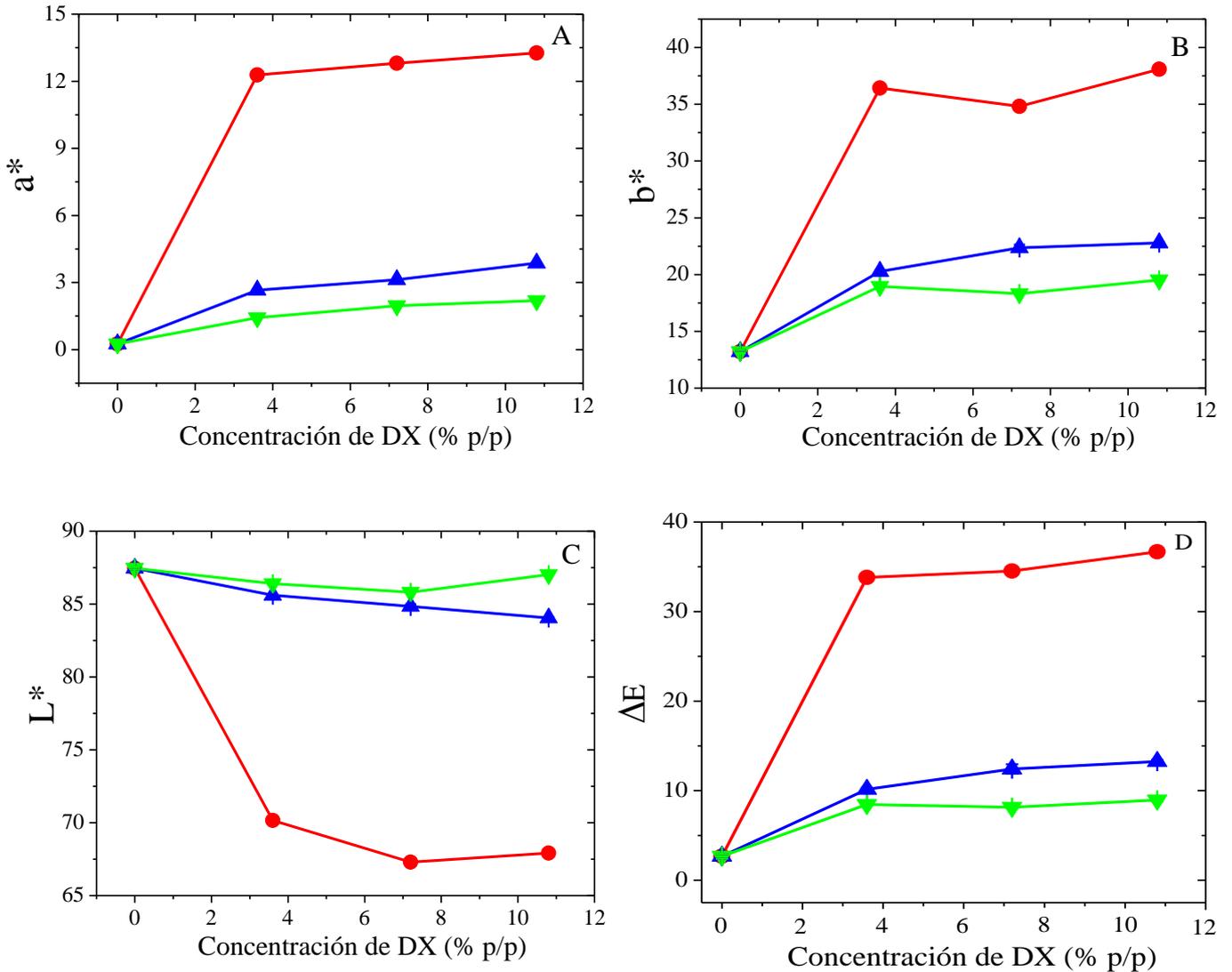


Figura 4.21. Parámetros de color CIE Lab: a^* (A), b^* (B), L^* (C) y ΔE (D) de polvos conjugados WPI/DX con DX 6 (●), 40 (▲) y 70 (▼) kDa.

Podemos observar que los parámetros a^* (+ rojo, - verde) y b^* (+ amarillo, - azul) aumentan hacia el rojo y el amarillo, respectivamente, y el parámetro L^* (luminosidad) disminuye, a medida la concentración de DX aumenta. La misma tendencia se observa cuando

el peso molecular del DX disminuye, siendo el aumento en a^* y en b^* (y la disminución en L^*) muy marcado para el DX de 6 kDa (menor peso molecular), indicando que este sistema WPI/DX llega a etapas más avanzadas de la reacción de Maillard. Como se dijo anteriormente, esto probablemente sea debido a un menor impedimento estérico para interaccionar con las moléculas de proteínas, así como a un mayor número de grupos carbonilos disponibles para reaccionar a una misma concentración de DX; lo que hace que la reacción se produzca en mayor extensión.

El cambio de color ΔE medido con respecto a WPI liofilizado no incubado es muy marcado para el DX de menor PM. La mínima concentración utilizada de DX aumenta más de 12 veces el color del polvo incubado. Aumentos subsiguientes en el DX no aumentan de forma significativa el ΔE .

Para los DX de 40 y 70 kDa el ΔE no es tan marcado, aunque es mayor con el DX de 40 en comparación con el de 70 kDa. En la **Figura 4.21 D** se puede apreciar que el peso molecular del DX es una variable significativa en el ΔE , mientras la concentración de DX no influye tanto.

El color de los sistemas WPI/DX conjugados puede ser también observado en los geles obtenidos con ellos, presentes en la **Figura 4.22**.

En la **Figura 4.22 A** se encuentran los geles mixtos de WPI/DX 6 kDa. Cabe destacar que los geles mixtos WPI/DX realizados con los demás dextranos (40 y 70 kDa) fueron de igual color y apariencia, y por eso fueron omitidos en esta figura. Todos los geles mixtos WPI/DX fueron translúcidos, la presencia de DX le confería cierta opacidad (muy leve) que aumentaba con la concentración, pero no con el peso molecular.

En la **Figura 4.22 B** se encuentran los geles WPI/DX 6 kDa conjugados. Como se puede apreciar, el color de los geles aumenta de izquierda a derecha, a medida que aumenta la concentración de DX. Los geles conjugados WPI/DX con 7,2 y 10,8 % p/p obtenidos con el

DX de 6 kDa no fueron autosostenibles. Estos geles tuvieron apariencia gelatinosa, presentaban alta viscosidad, pero no se podían desmoldar en forma de cilindros por su falta de consistencia, a diferencia de sus correspondientes geles mixtos (**Figura 4.22 A**).

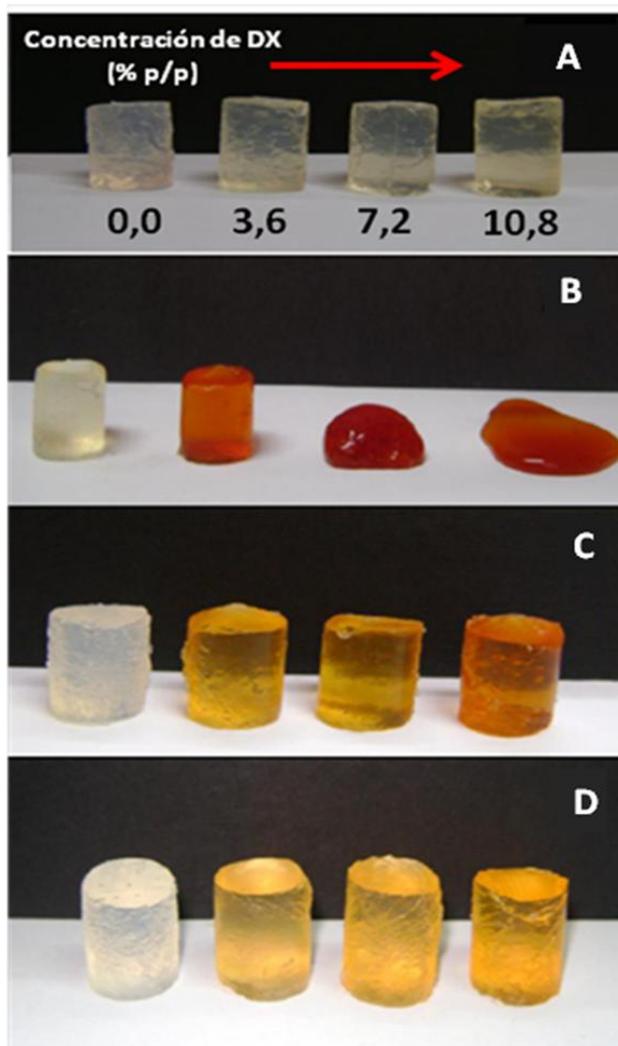


Figura 4.22. Geles WPI/DX mixtos con DX de 6 kDa (A) y conjugados con DX de 6 (B), 40 (C) y 70 (D) kDa.

En la **Figura 4.22 C y D** se encuentran los geles de WPI conjugados a DX de 40 y 70 kDa, respectivamente. Todos ellos fueron autosostenibles, como muestra la fotografía, y tuvieron un color amarillento que disminuía cuando aumentaba el peso molecular del DX,

pero aumentaba con el aumento en la concentración del mismo. La tendencia de color fue igual que la obtenida mediante los parámetros CIE Lab.

Hay que destacar que todos los geles presentaron cierta transparencia, aún los geles WPI/DX conjugados. Los geles de WPI incubados 5 días (primer gel de la **Figura 4.22 B, C y D**) fueron un poco más opacos que el gel de WPI no incubado. Igualmente esta opacidad no es significativa, como se observa en la Figura. Esto puede ser debido a que durante el tiempo de incubación a 60 °C se pudieron haber producido agregados que luego contribuyeron a esta característica.

Se sabe que bajo condiciones que promueven repulsiones electrostáticas entre moléculas de proteína, como a pH 7, la agregación se ve obstaculizada y las proteínas de suero pueden formar una estructura de gel transparente o translúcida de finos filamentos, mientras que bajo condiciones de baja repulsión electrostática (como a pH cerca del pI de las proteínas), se produce la agregación de proteínas antes de la formación de gel y, en consecuencia se obtienen geles opacos de microestructura particulada (Langton & Hermansson, 1992; Aguilera, 1995).

4.2.4. Absorción UV-Vis (sistemas conjugados DX 6, 40 y 70 kDa)

En la **Figura 4.23** se puede observar la diferencia en los espectros de absorbancia de los sistemas de WPI y WPI/DX de 6, 40 y 70 kDa con respecto al WPI no incubado, desde los 200 a los 450 nm.

La absorbancia varía en función de la concentración de dextrano y de su peso molecular. Hay un fuerte aumento en la absorbancia en los conjugados cerca de los 250 y 300 nm, especialmente para los sistemas conjugados con el dextrano de 6 kDa. Como se dijo en la Sección 4.1.3, esto es debido a que los productos tempranos de la reacción de Maillard absorben a cerca de los 250 y 300 nm. Este aumento en la absorbancia es más pronunciado a

mayor concentración de dextrano y menor peso molecular, ya que en estas condiciones la reacción de Maillard tiene un mayor progreso, como se vio en el análisis de grupos amino libres y desarrollo de color (Sección 4.2.2 y 4.2.3).

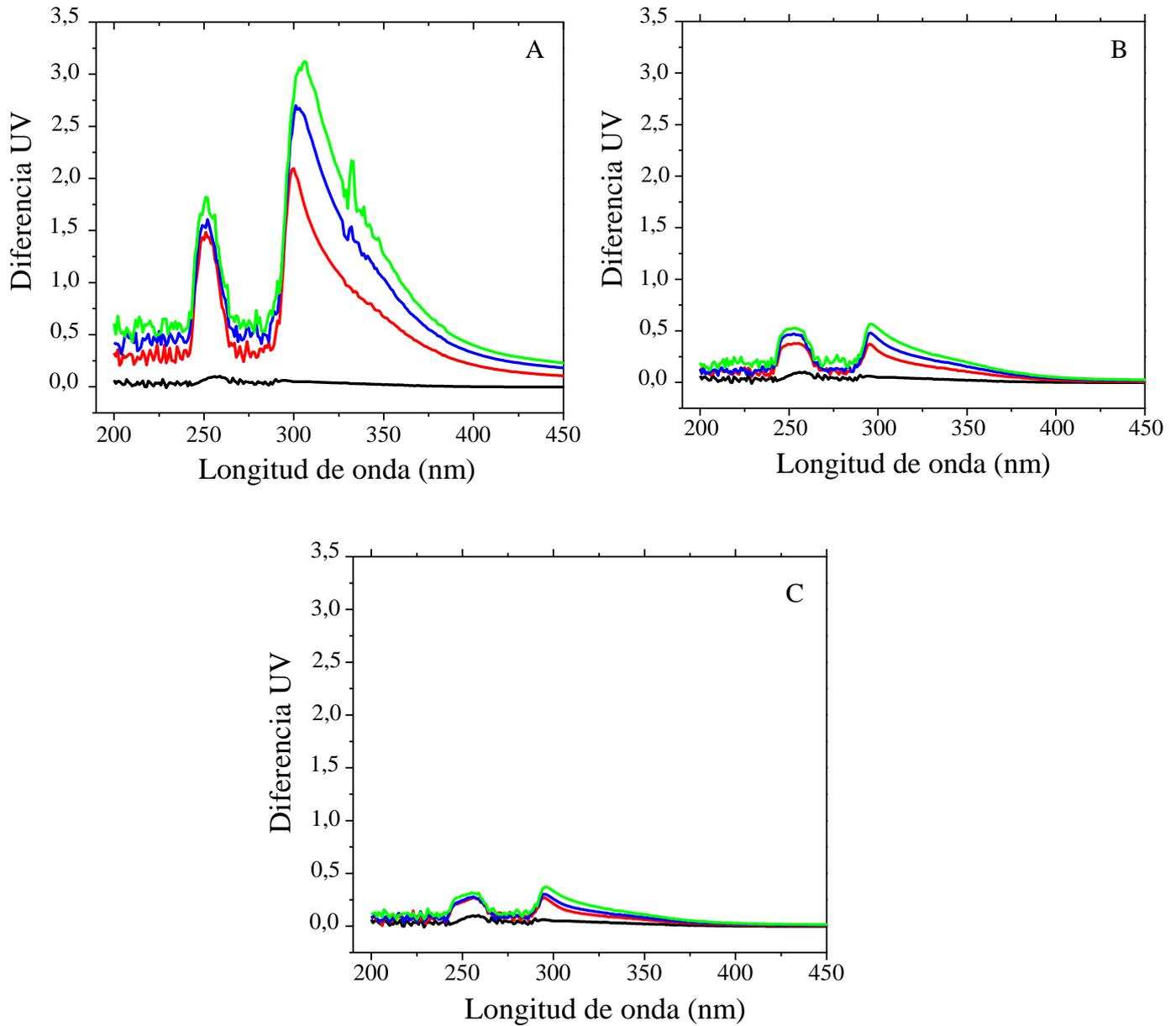


Figura 4.23. Diferencia de absorbancia (DUV) WPI/DX con DX de 6 kDa (A), 40 kDa (B) y 70 kDa (C). Las concentraciones de DX en los sistemas WPI/DX son: 0 (—), 0,15 (—); 0,30 (—) y 0,45 % p/p (—). En todos los sistemas la conc. de WPI fue de 0,5 % p/p.

Por otro lado, el sistema WPI/DX6 tiene una absorción en el UV mucho mayor a los demás sistemas con dextrano de mayor peso molecular.

Se tomaron las medidas puntuales de absorbancia a 284, 304 y 420 nm, ya que según la bibliografía consultada las dos primeras absorbancias corresponden a los productos tempranos de la reacción de Maillard y la última, a los compuestos tardíos de la misma (como se realizó en la Sección 4.1.3).

En la **Figura 4.24 A** se observa la absorbancia a 284 nm, que corresponde a la formación del reactivo de Schiff y en la **Figura 4.24 B** se observa la absorbancia a 304 nm, que corresponde a los productos de Amadori. En ambas, la absorbancia para los sistemas WPI/DX con el DX de 6 kDa es notablemente mayor que para los sistemas con los demás DX, indicando que este DX es mucho más reactivo que los de mayor PM.

En la **Figura 4.24 C** se observa la absorbancia a 420 nm de los sistemas estudiados. La medida de absorbancia a 420 nm es indicativa del pardeamiento que sufren las muestras cuando se produce la reacción de Maillard en las etapas más avanzadas de la misma (Sun, Hayakawa & Izumori, 2004; Chawla et al., 2009; Lertittikul et al., 2007; Sato, Katayama, Sawabe & Saeki, 2003; Jiménez-Castaño et al., 2007). La absorbancia de las muestras varía en función de la concentración de dextrano y de su peso molecular; la misma aumenta a medida que aumenta la concentración de DX y disminuye su PM. Resultados similares fueron encontrados por Jiménez-Castaño et al. (2007), donde estudiaron β -lg, α -lc y albúmina sérica bovina (ASB) conjugadas a dextranos de 10 y 20 kDa.

En las tres figuras, la presencia de DX de 6 kDa, a la menor concentración usada presenta un aumento muy significativo de la absorbancia, mientras que para las otras concentraciones se tiende a un valor límite. En cambio, las tres curvas con el DX de 40 kDa tienen una tendencia lineal con un crecimiento menos pronunciado que para el DX de 6 kDa. Resultados similares se obtuvieron para el DX de 70 kDa.

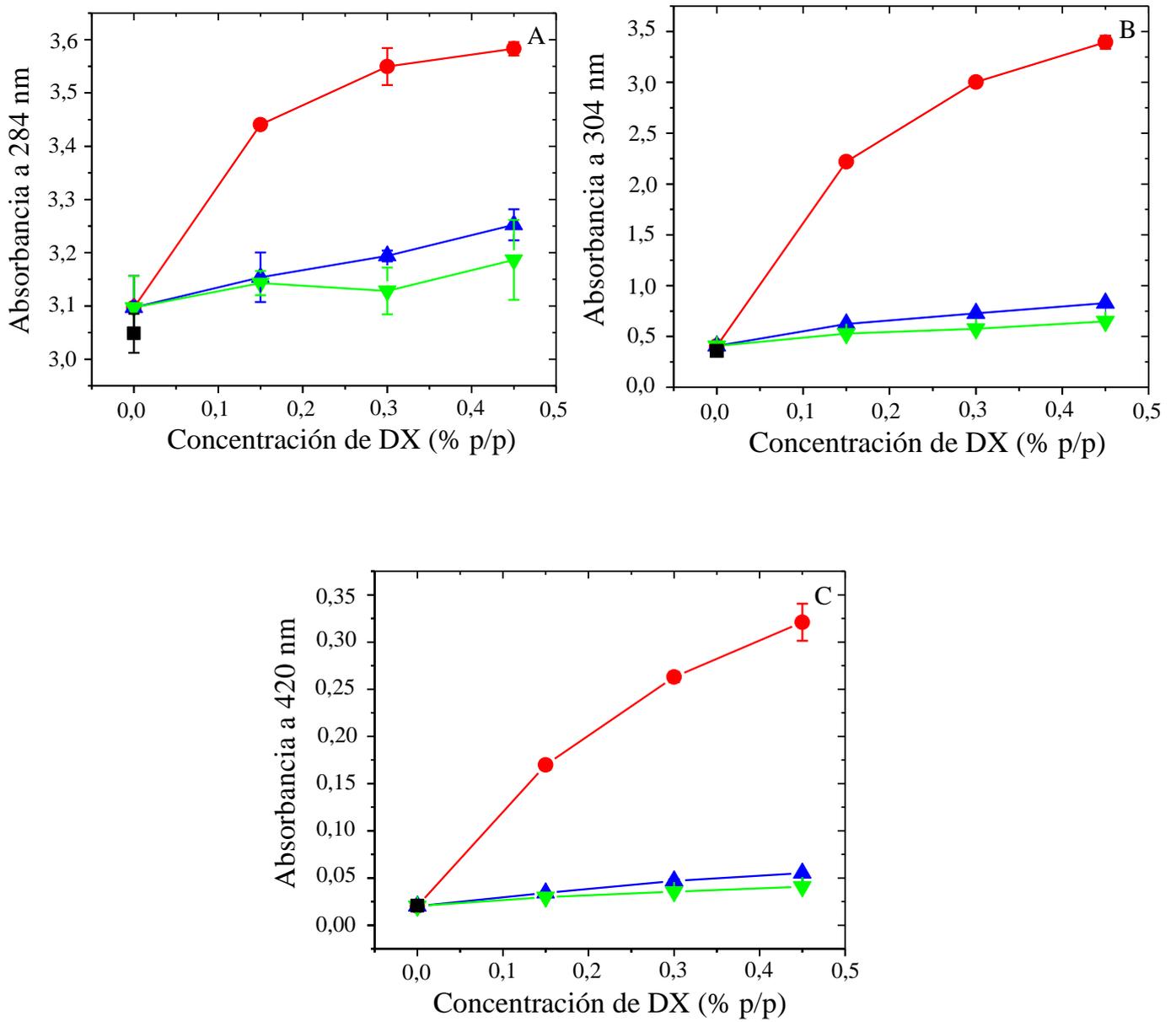


Figura 4.24. Absorbancia a 284 (A), 304 (B) y 420 (C) nm de WPI no incubado (■) y sistemas WPI/DX incubados 5 días con DX de 6 (●), 40 (▲) y 70 kDa (▼).

4.2.5. Fluorescencia intrínseca (sistemas conjugados DX 6, 40 y70 kDa)

La fluorescencia intrínseca indica cambios en la estructura terciaria de las proteínas (Broersen et al., 2004). En la **Figura 4.25** se observa el espectro de emisión de fluorescencia intrínseca del WPI nativo (no incubado) y de WPI y sistemas WPI/DX incubados.

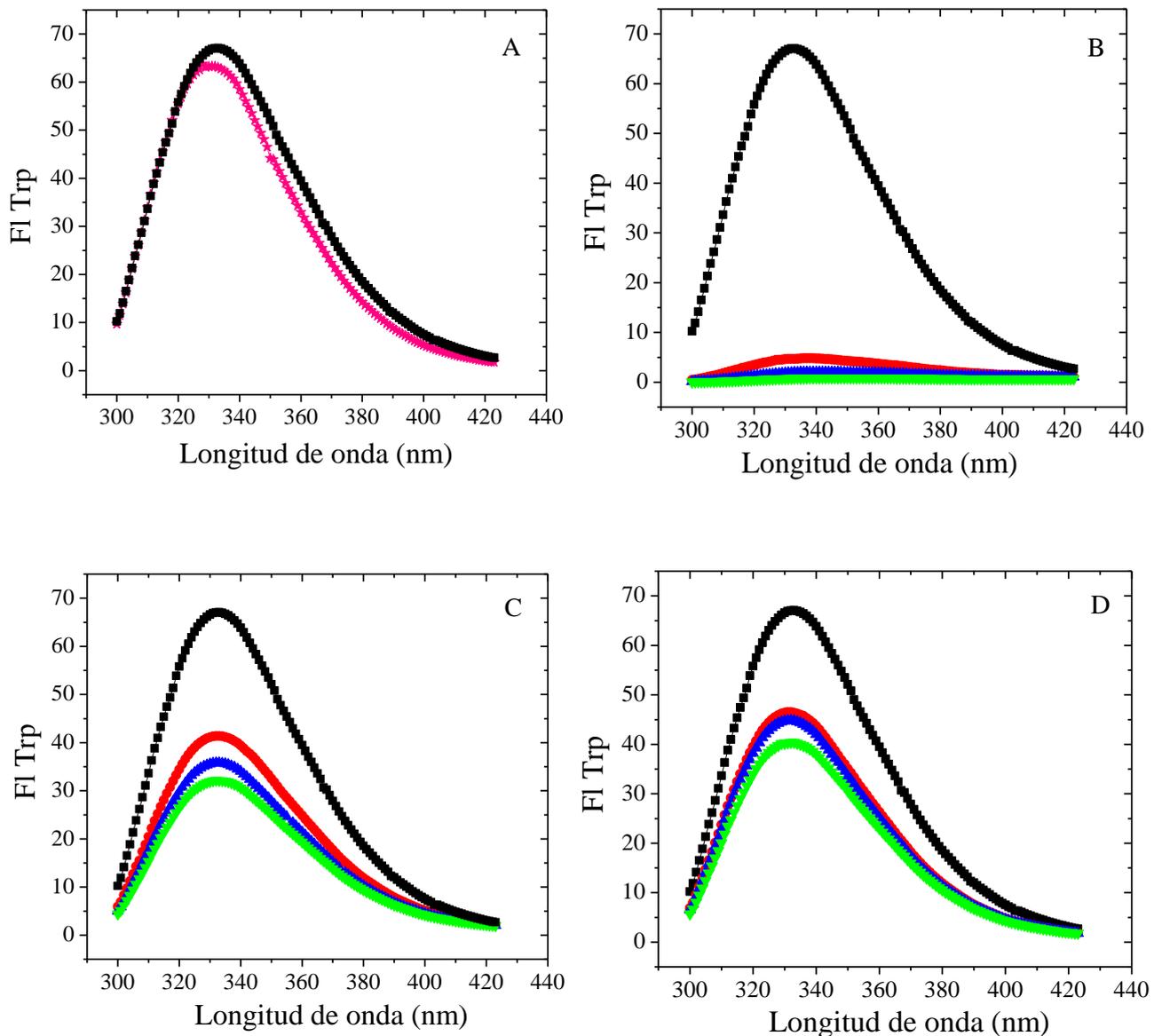


Figura 4.25. Fluorescencia intrínseca de WPI no incubado (0,5 % p/p) (★), WPI incubado 5 días (0,5 % p/p) (■) y WPI/DX incubados 5 días con 0,15 (●), 0,30 (▲) y 0,45 % p/p (▼) de DX de 6 (A), 40 (B) y 70 (C) kDa.

Como se puede observar en la **Figura 4.25 A**, la fluorescencia del WPI incubado 5 días a 60°C en ausencia de DX es un poco mayor al del WPI nativo, lo que podría indicar cambios estructurales debidos a desnaturalización parcial (Jiménez-Cataño et al., 2005).

En el caso de los conjugados (**Figura 4.25 B, C y D**), la intensidad de fluorescencia de todos los sistemas conjugados WPI/DX es menor a la del WPI incubado 5 días. En estos sistemas la fluorescencia disminuye a medida que la concentración de DX aumenta.

Si se comparan las **Figuras 4.25 B, C y D**, se puede observar que a medida que el PM del DX disminuye, la fluorescencia también. La disminución de la fluorescencia es muy marcada en el caso de los sistemas WPI/DX con el DX de 6 kDa. Esto puede ser debido a la formación de los productos de la reacción de Maillard, ya que se vería afectada la estructura terciaria de las proteínas por la unión covalente del polisacárido y por la formación de compuestos poliméricos en las etapas avanzadas de la reacción (Sun et al., 2004).

La polaridad del ambiente que rodea a los residuos de Trp afecta la $\lambda_{\text{máx}}$ (λ que corresponde a la intensidad máxima de emisión). La energía promedio de emisión de los residuos de trp usualmente presenta un corrimiento hacia el rojo debido a su exposición al solvente. Esto es debido a cambios conformacionales alrededor de los residuos de Trp (en la β -Igl el Trp19 y el Trp61) (Jiménez-Castaño, López-Fandiño, Olano & Villamiel, 2005; Hattori, Ametani, Katakura, Shimizu, & Kaminogawa, 1993). El WPI incubado 5 días y los sistemas conjugados WPI/DX (incubados 5 días) con los DX de 40 y 70 kDa tienen un ligero movimiento hacia el rojo ($\lambda_{\text{máx}}$ 333 nm) de la emisión máxima del WPI nativo ($\lambda_{\text{máx}}$ 331 nm), pero para el conjugado WPI/DX con DX de 6 kDa el corrimiento es más pronunciado, llegando a 342 nm. Dado que el DX de 6 kDa es el polisacárido de menor peso molecular, también es el más reactivo, por lo que en este sistema el WPI probablemente sufrió más cambios en su estructura.

Resultados similares fueron encontrados por Ibrahim, Kobayashi & Kato (1993) y Renard, Lefebvre, Griffin & Griffin (1998).

4.2.6. Fluorescencia de productos de la reacción de Maillard (sistemas conjugados DX 6, 40 y 70 kDa)

En la **Figura 4.26** se encuentra la emisión de fluorescencia de los productos de la reacción de Maillard (PRM) de sistemas WPI y WPI/DX incubados 5 días a las distintas concentraciones estudiadas, cuando fueron excitados con una λ_{ex} de 365 nm.

La emisión de fluorescencia del WPI no incubado como el incubado 5 días es insignificante (**Figura 4.26 A**), indicando que no se producen compuestos fluorescentes sin la presencia del polisacárido.

Para los demás sistemas WPI/DX, la emisión de fluorescencia aumenta a medida que aumenta la concentración de DX. Comparando los distintos gráficos también podemos observar un aumento en la emisión de fluorescencia a medida que disminuye el PM del DX. Si comparamos los resultados obtenidos con los ensayos previos de absorbancia de intermediarios tempranos y tardíos de la reacción de Maillard podemos ver que existe una relación entre la formación de los mismos y la intensidad fluorescencia de las **Figuras 4.26, B, C y D**. Resultados similares fueron encontrados por Sun et al. (2004), trabajando con ovoalbúmina y diferentes azúcares, donde los sistemas que más fluorescencia por PRM presentaban ($\lambda_{\text{ex}} = 350$, $\lambda_{\text{em}} = 415$), eran los que tenían más absorbancia a 420 nm.

Estos gráficos son opuestos a los obtenidos para fluorescencia intrínseca, ya que presenta mayor fluorescencia el DX de 6 kDa y menor fluorescencia el DX de 70 kDa. Resultados similares fueron obtenidos por Baisier & Labuza (1992), trabajando sistemas Glicina/Glucosa de varias concentraciones.

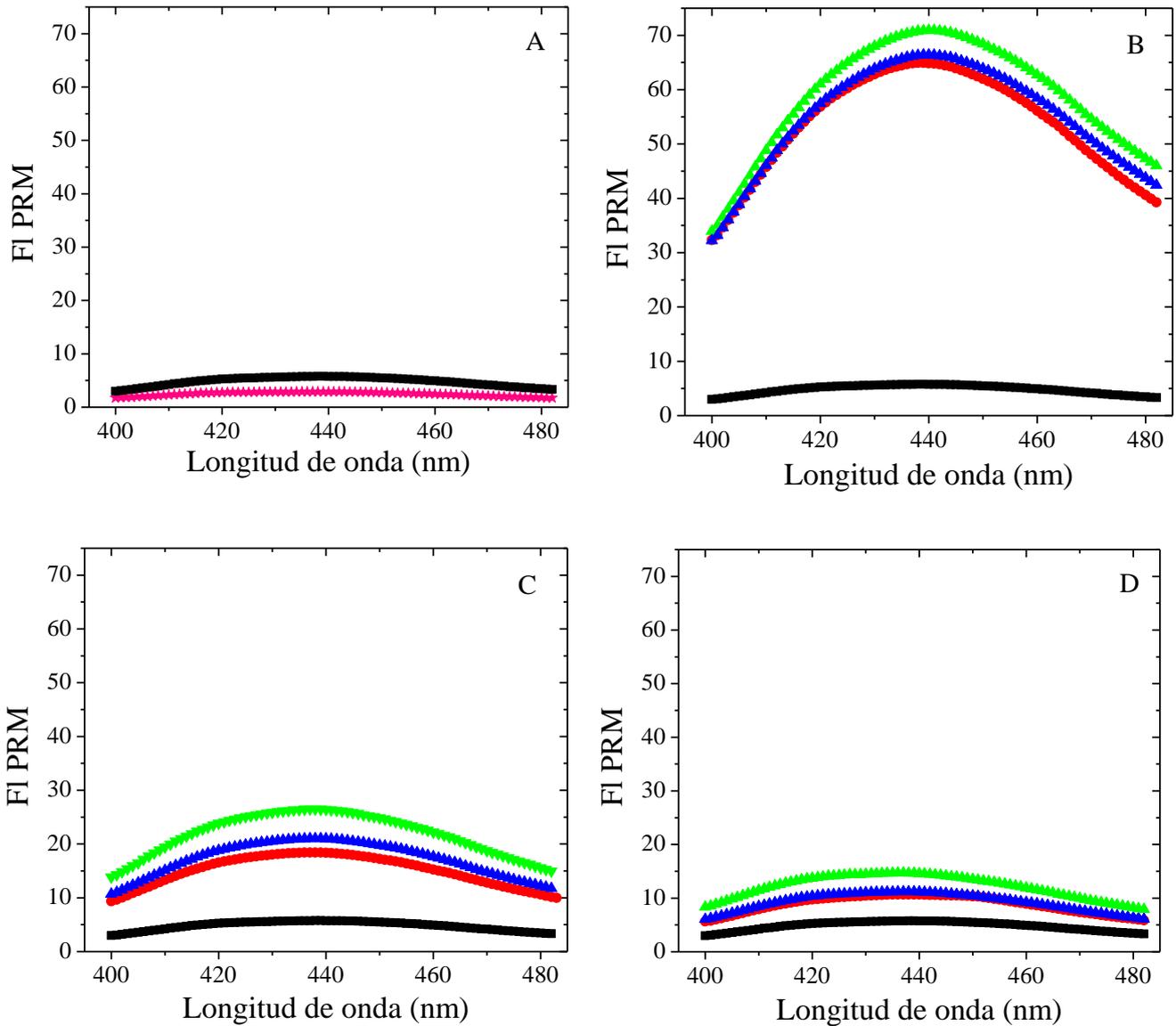


Figura 4.26. Emisión de fluorescencia de los productos de reacción de Maillard (PRM) ($\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$) para sistemas WPI nativo (\star) y WPI incubado (\blacksquare) (A); y WPI/DX incubados 5 días con 0 (\blacksquare), 0,15 (\bullet), 0,30 (\blacktriangle) y 0,45 % p/p (\blacktriangledown) de DX de 6 (B), 40 (B) y 70 (C) kDa.

4.2.7. Reología Dinámica Oscilatoria (sistemas mixtos y conjugados DX 6, 40 y70 kDa)

En esta sección se estudió la dinámica de gelificación de los siguientes sistemas:

- WPI no incubado al 12 % p/p
- WPI al 12% p/p incubado 5 días
- WPI al 12% p/p y DX de 6, 40 y 70 kDa al 7,2 % p/p no incubados (mixtos)
- WPI al 12% p/p y DX de 6 40 y 70 kDa al 7,2 % p/p incubados 5 días

Se eligió la concentración de DX central (7,2 % p/p) para obtener un comportamiento representativo de la influencia de los pesos moleculares.

En la **Figura 4.27** y **4.28** se muestra la evolución de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') en función del tiempo y la temperatura, de los sistemas WPI y WPI/DX no incubados e incubados, respectivamente.

Al inicio todos los sistemas presentaron oscilaciones en G'' y G' , con valores de G'' más grandes que G' , hasta que en el punto de gel, G' superó a G'' y siguió creciendo con el aumento de temperatura. En la etapa de enfriamiento G' aumentó hasta llegar a un valor constante. Se puede observar que luego del punto gel, G'' siempre fue menor que G' .

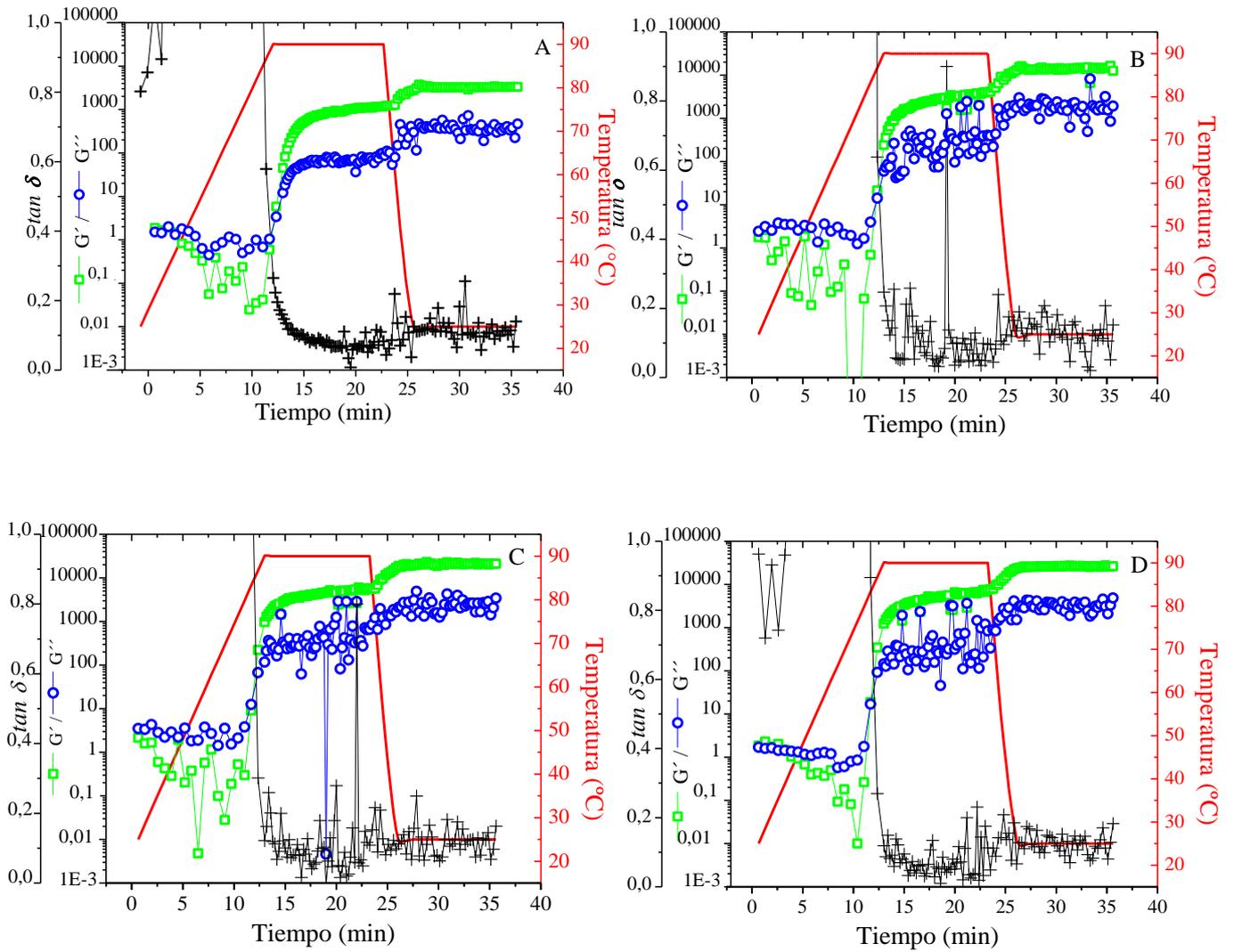


Figura 4.27. Evolución de G' (■), G'' (●) y $\tan \delta$ (+) durante la gelificación inducida por calor de: una solución de WPI (A) y soluciones mixtas (no incubadas) WPI/DX con DX de 6, (B), 40 (C) y 70 (D) kDa.

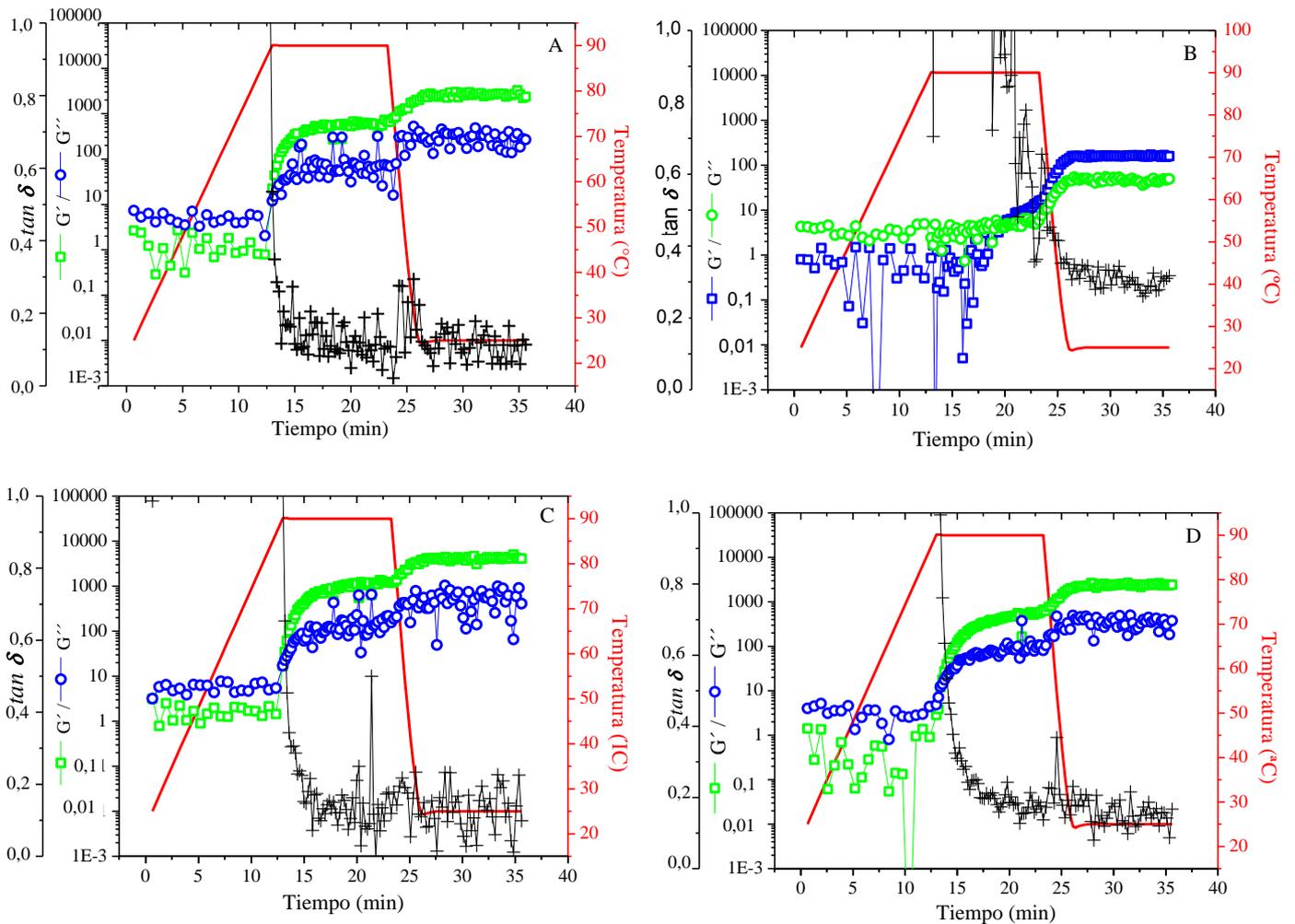


Figura 4.28. Evolución de G' (■), G'' (●) y $\tan \delta$ (+) durante la gelificación inducida por calor de una solución de WPI (A) y soluciones WPI/DX con DX de 6, (B), 40 (C) y 70 (D) kDa incubadas 5 días.

A modo comparativo, en la **Figura 4.29** se graficaron los módulos elásticos (G') de todos los sistemas estudiados en función del tiempo y la temperatura, omitiendo el módulo viscoso (G''). Se puede observar que G' alcanza valores mucho más altos para los sistemas mixtos en relación a los conjugados. En la **Figura 4.29 A** se puede observar que la presencia

de DX en el sistema mejora la velocidad de agregación y la resistencia del gel (aumento en G'), pero afecta muy poco en realidad la forma de la curva de gelificación. Por lo tanto, no modificaría intrínsecamente el mecanismo de agregación y la estructura del gel (Gonçalves, Torres, Andrade, Azero & Lefebvre, 2004).

Por otro lado en la **Figura 4.29 B** se puede observar que G' disminuye o se mantiene igual que el WPI incubado en los conjugados, indicando que hay una disminución de G' a medida que la reacción de Maillard tiene lugar, siendo el sistema conjugado WPI/DX con DX de 6 kDa el que presenta una diferencia muy marcada en la curva con respecto al WPI incubado.

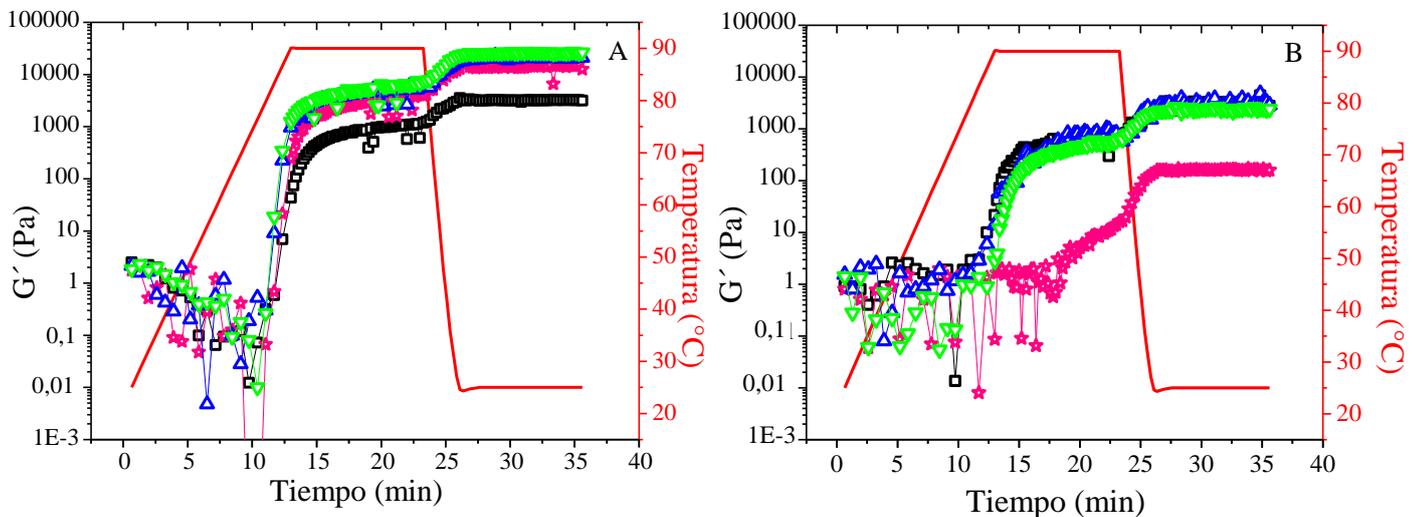


Figura 4.29. Evolución del módulo elástico (G') en función del tiempo y la temperatura para sistemas WPI/DX mixtos (no incubados) (A) y (B) sistemas WPI/DX conjugados (incubados) donde (■) WPI; (★) WPI/DX 6; (▲) WPI/DX 40 y (▼) WPI/DX 70. En todos los sistemas:

12% p/p WPI 12 % y 7,2 % de DX.

Los valores de G' a 90°C y a 25°C (promedios de los últimos puntos para cada temperatura) se encuentran en la **Figura 4.30**. Como puede observarse, el módulo a 90 °C y a

25 °C tiene la misma tendencia pero alcanza valores más altos a 25°C. Los geles se refuerzan considerablemente cuando la temperatura disminuye de 90 a 25 °C (aumento en G'), lo que señala la importancia de los enlaces de hidrógeno en la estructura de gel (Gonçalves et al., 2004). El incremento de G' durante el enfriamiento se ha observado para muchas proteínas globulares.

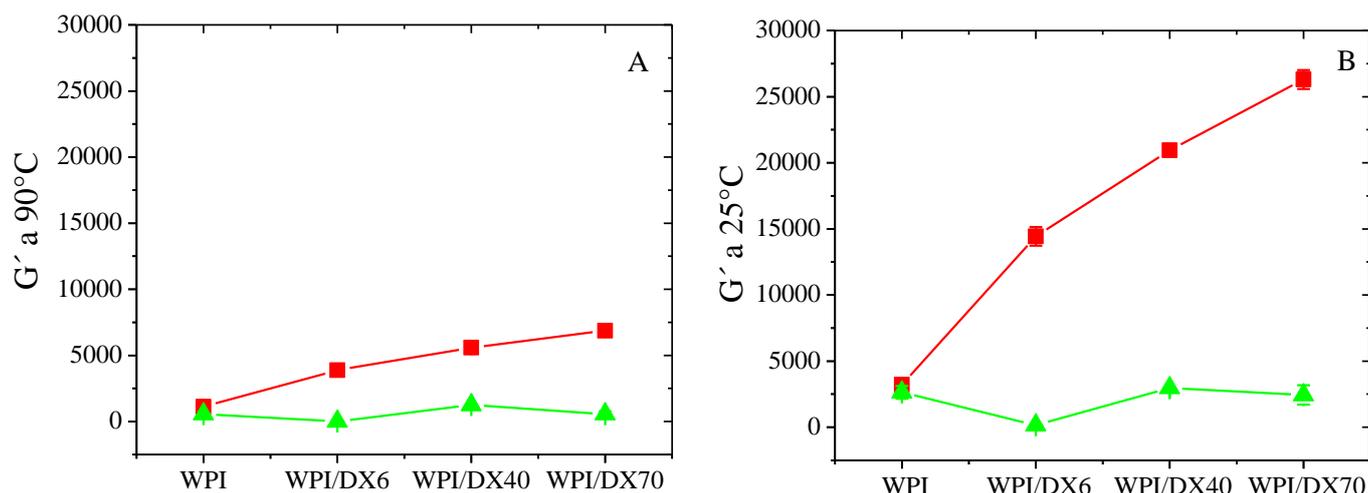


Figura 4.30. Módulo elástico (G') a 90 y 25°C de sistemas WPI/DX mixtos (no incubados) (■) y sistemas WPI/DX conjugados (incubados) (▲) con DX de distintos pesos moleculares.

En sistemas mixtos, los valores de G' a 90°C y a 25°C aumentaron a medida que el PM del DX fue mayor. El aumento en G' indica un aumento en la rigidez del gel (Tavares & Lopes da Silva, 2003) y está relacionado a una menor $\tan \delta$ (Tabla 4.5), que indica aumento de su carácter elástico. Resultados similares, donde un polisacárido no gelificante con carga neutra aumenta la fuerza de gel, se encontraron para otros sistemas mixtos de proteínas de suero trabajando en condiciones semejantes de concentración, pH, fuerza iónica, etc.

Ejemplos de ellos son los sistemas WPI/goma Locust Bean de diferentes pesos moleculares (Monteiro et al., 2005) y con diferente grado de ramificación (Tavares et al., 2005). En esos trabajos se halló un aumento de carácter sólido mediante reología oscilatoria y hubo una relación entre el carácter sólido del gel y el peso molecular del polisacárido. Otros estudios donde se evidenció un aumento de G' con la presencia de polisacáridos neutros a pH 7 fueron, por un lado, el llevado a cabo por Fitzsimons et al. (2008) trabajando con goma Guar, y por el otro, el realizado por Gonçalves et al. (2004) trabajando con WPI y un galactomanano llamado *Cassia javanica* (CJ). En ambos se observó que la presencia del polisacárido modifica el comportamiento de gelificación del WPI y que este efecto dependió de la concentración del polisacárido.

Los valores de G' de los sistemas conjugados fueron más bajos que los correspondientes sistemas mixtos. El valor de G' disminuyó para el sistema conjugado WPI/DX6, mientras para los sistemas conjugados WPI/DX 40 y 70, los valores de G' fueron muy parecidos al del WPI incubado. De estos resultados podemos concluir que, al contrario de los sistemas mixtos, la formación de conjugados debilitó la dureza de los geles.

De cada gráfica de G' y G'' en función del tiempo y la temperatura se determinó el punto de cruce entre G' y G'' (punto gel), estableciendo para cada sistema la temperatura y el tiempo de gelificación (**Tabla 4.5**).

En los sistemas mixtos, la T_{gel} en algunos fue igual o en otras disminuyó con respecto al WPI nativo. En los sistemas incubados, T_{gel} aumentó con respecto a los sistemas mixtos, siendo este aumento más pronunciado para los sistemas conjugados WPI/DX que para el WPI incubado.

Con respecto a t_{gel} , la presencia de DX en los sistemas mixtos o no modifica (sistema WPI/DX6 y 40 mixtos) o disminuye (sistema WPI/DX 70 mixto) este parámetro. Resultados

similares fueron obtenidos por Bertrand & Turgeón (2007), en sistemas WPI/goma Xántica, donde el polisacárido disminuyó la t gel y aumentó el G´.

Tabla 4.5. Tiempo (t gel) y Temperatura (T gel) de gelificación de sistemas WPI 12% p/p/DX 7,2% p/p mixtos (0 días de incubación) y conjugados (5 días de incubación) mediante reacción de Maillard.

| Sistema | Días de Incubación | t gel (Min) | T gel (°C) | tan δ |
|---------------|--------------------|-------------|-------------|-------------|
| WPI | 0 | 12,0 ± 0,0 | 85,0 ± 0,0 | 0,12 ± 0,01 |
| WPI | 5 | 12,7 ± 0,0 | 88,4 ± 0,0 | 0,12 ± 0,01 |
| WPI/DX 6 kDa | 0 | 12,0 ± 0,0 | 85,0 ± 0,0 | 0,16 ± 0,07 |
| WPI/DX 6 kDa | 5 | 18,6 ± 0,4 | 90,0 ± 0,0* | 0,31 ± 0,08 |
| WPI/DX 40 kDa | 0 | 12,0 ± 0,0 | 85,0 ± 0,0 | 0,13 ± 0,04 |
| WPI/DX 40 kDa | 5 | 12,9 ± 0,3 | 89,3 ± 1,2* | 0,11 ± 0,05 |
| WPI/DX 70 kDa | 0 | 11,7 ± 0,5 | 83,3 ± 2,4 | 0,13 ± 0,03 |
| WPI/DX 70 kDa | 5 | 13,3 ± 0,3 | 90,0 ± 0,0* | 0,18 ± 0,09 |

Los sistemas conjugados son los que se incubaron 5 días a 60°C y 64% de humedad relativa.

**Temperatura constante en la curva de calentamiento-enfriamiento.*

En sistemas conjugados, la presencia de DX aumenta la t gel. Para el sistema WPI/DX de 6 kDa el aumento en el tiempo de gelificación es bastante más acentuado con respecto a los demás sistemas conjugados, siendo el que más diferencias presenta con respecto al WPI nativo. En otros estudios de sistemas conjugados de WPI y lactosa (obtenidos mediante mezcla) mediante reología oscilatoria se encontraron resultados similares (Rich & Foegeding,

2002). Estos autores atribuyeron el aumento en la temperatura y el tiempo de gelificación en sistemas conjugados a una protección a la desnaturalización del WPI por parte de la lactosa.

4.2.7.1. Espectros mecánicos (sistemas mixtos y conjugados DX 6, 40 y70 kDa)

El espectro mecánico de los geles mixtos y conjugados se encuentra en las **Figuras 4.31 y 4.32**, respectivamente. La dependencia de G' con la frecuencia da información acerca del tipo de estructura que presenta el gel (Stading & Hermansson, 1992).

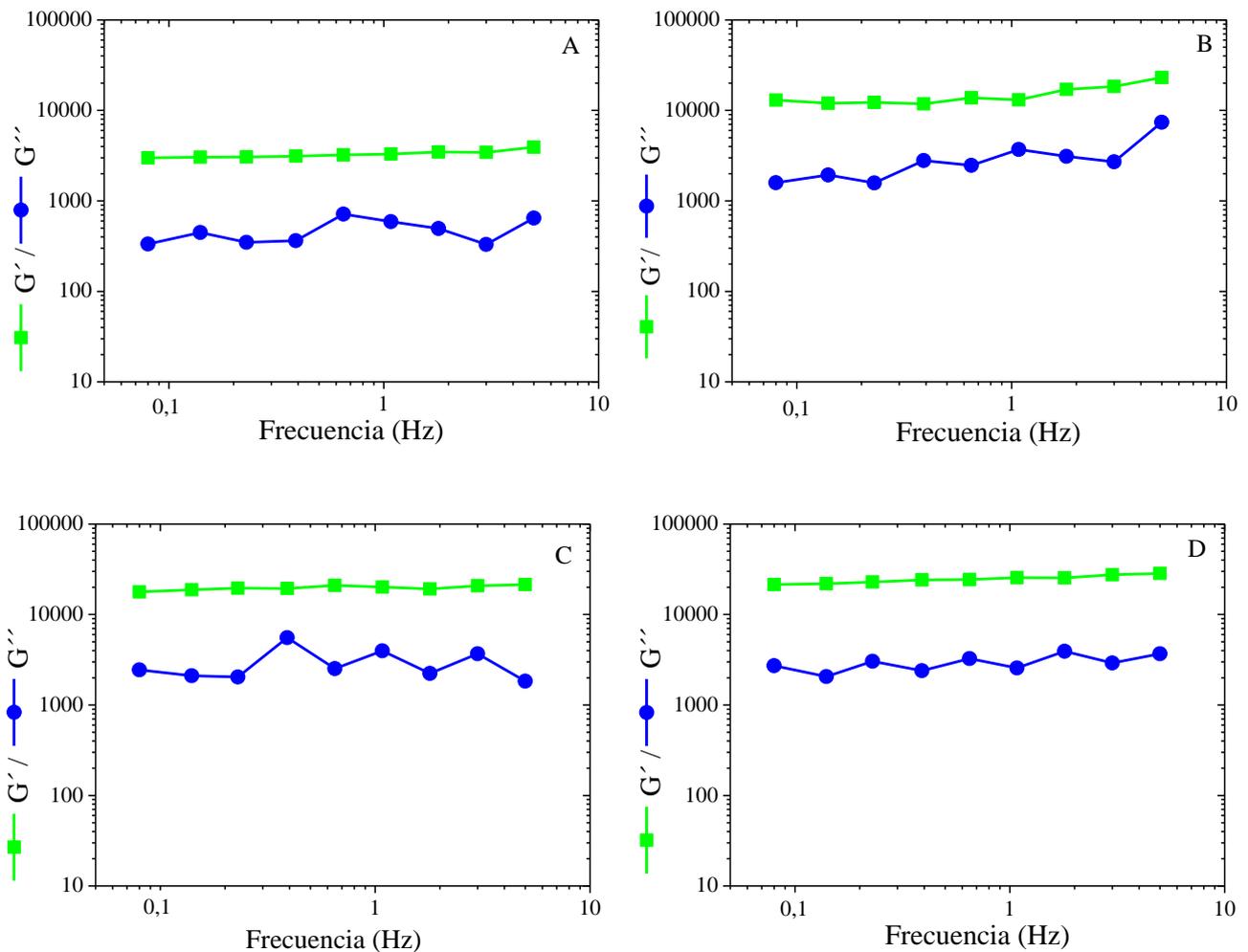


Figura 4.31. Barrido de frecuencia de geles WPI (A) y WPI/DX mixtos con DX de 6 (B), 40 (C) y 70 kDa (D). (En todos ellos 12% p/p WPI y 7,2% p/p DX).

En la **Figura 4.31** se muestra que todos los geles mixtos son estables (G' más grande que G'' en todo el rango de frecuencia) y que G' prácticamente no varía con la frecuencia aplicada. También se puede observar que los valores de G' son mayores a medida que aumenta el PM de los DX. Resultados similares fueron obtenidos por Tavares et al. (2005), trabajando con WPI y diferentes galactomananos donde la presencia de polisacáridos en sistemas mixtos aumentó la rigidez del gel (aumento de G') en los barridos de frecuencia.

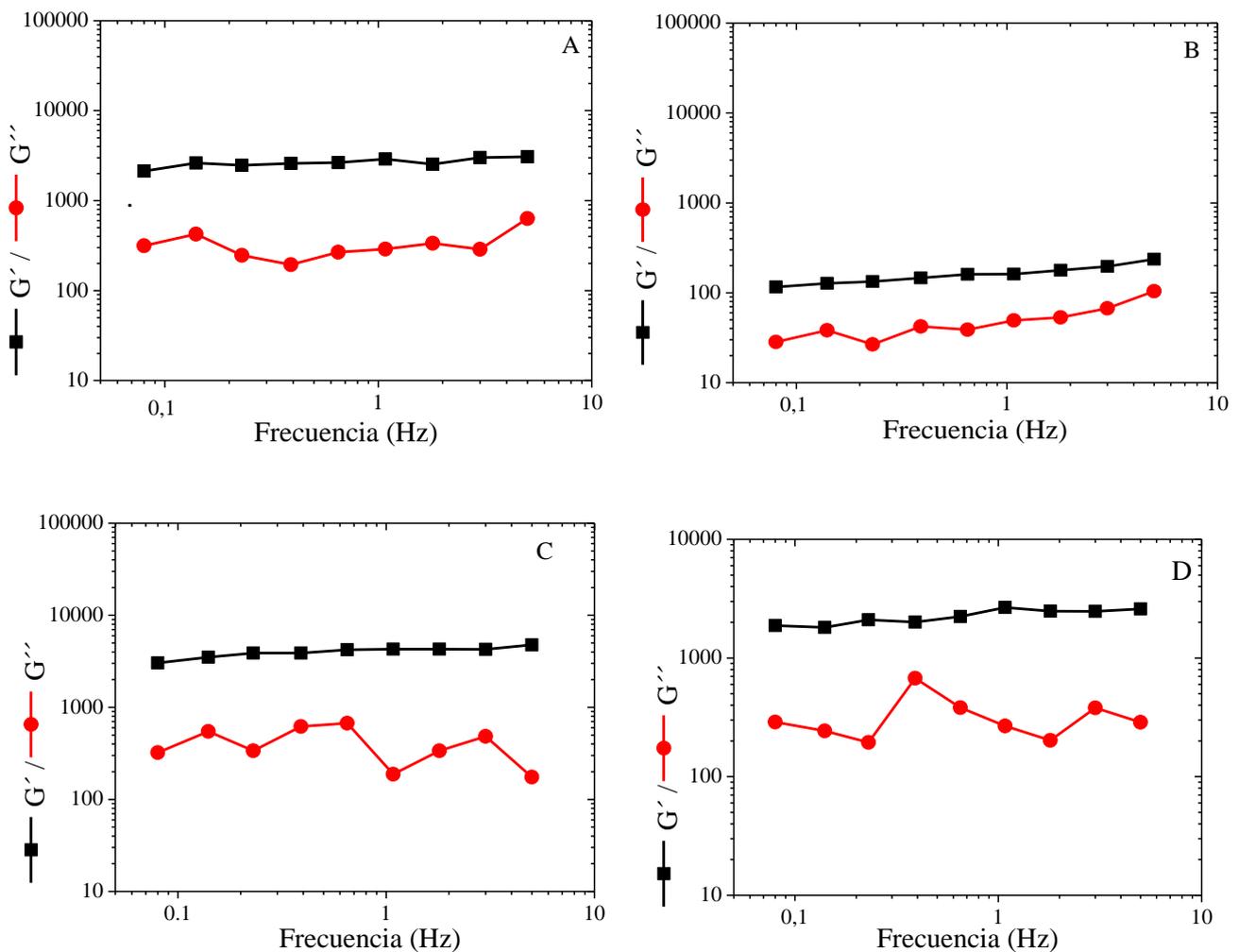


Figura 4.32. Barrido de frecuencia de geles de WPI incubado 5 días (A) y geles de WPI/DX con DX de 6 (B), 40 (C) y 70 (D) kDa. (En todos ellos 12% p/p WPI y 7,2% p/p DX).

En la **Figura 4.32** se puede observar que los valores de G' de los sistemas conjugados son mucho menores a los de sistemas mixtos. Además, en el sistema WPI/DX de 6 kDa (**Figura 4.32 B**) la separación entre G' y G'' es mucho menor que para los demás sistemas, indicando que hay una mayor fracción de “sol” de material que no forma parte de la red (Fitszsimons et al., 2008).

Con el análisis de los espectros mecánicos se puede inferir si un gel es fuerte o débil (Ross-Murphy, 1995). En los geles fuertes o verdaderos, los rearrreglos moleculares dentro de la red son muy reducidos en la escala de tiempo analizada. G' es mucho mayor que G'' , y G' es casi independiente de la frecuencia aplicada. En los geles débiles hay una gran dependencia con la frecuencia, sugiriendo la existencia de procesos de relajación ocurriendo en escala de tiempos cortos, y menores diferencias entre los valores de los módulos, indicando que se recupera un menor porcentaje de energía almacenada (Lopes da Silva & Rao, 1999). Como se puede observar de las **Figuras 4.31** y **4.32**, los geles mixtos tienen característica de geles fuertes, y los conjugados de geles más débiles.

Con los valores de G' y de frecuencia de los espectros mecánicos (G' vs. f), se calculó el valor del parámetro n , (Ec. 4 de materiales y métodos). El mismo se grafica en la **Figura 4.33** para todos los sistemas estudiados.

Como se puede observar, el valor de n del gel de WPI no incubado presenta una tendencia a ser mayor que para el WPI incubado, pero esta diferencia está solapada por el error de las mediciones, por lo que no es significativa. Por otro lado, la presencia de DX en sistemas mixtos disminuye el valor de n con respecto a los sistemas conjugados. Esto estaría indicando que los geles conjugados tienen menor naturaleza elástica comparados con los mixtos.

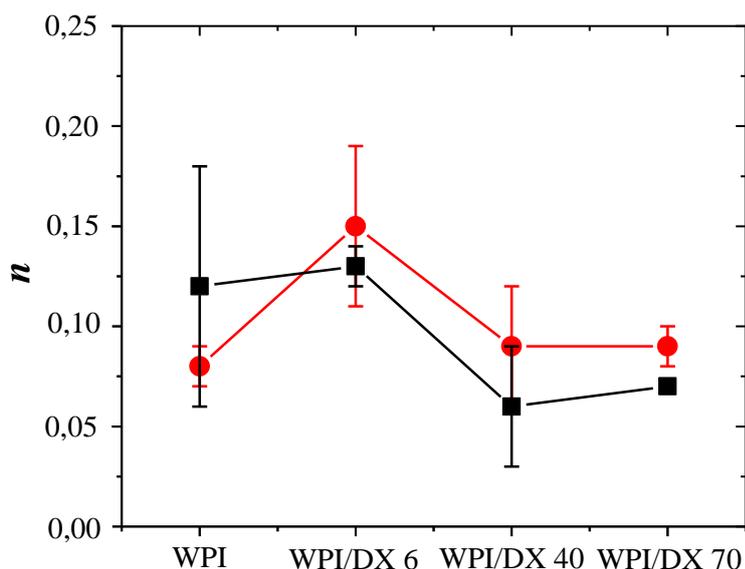


Figura 4.33. Valor de n para sistemas WPI/DX mixtos (■) y WPI/DX conjugados (●) con DX de distintos PM. (WPI a 0 días = WPI no incubado y WPI/DX a 0 días = WPI/DX mixto).

Según Fitzsimons et al. (2008), en los estudios donde se observó (Tavares et al, 2005.) o se infirió (Goncalves et al, 2004; Syrbe et al, 1995; Tavares & Lopes da Silva, 2003) la separación de fases, los incrementos o disminuciones en la resistencia de gel parecen ser demasiado grandes para ser explicadas solamente por aumentos de la concentración de proteína de suero en una fase continua, o por el efecto directo de la concentración del polisacárido. El concepto de un aumento en la resistencia del gel con creciente grado de asociación intermolecular/agregación, sin embargo, sería aplicable a sistemas de fases separadas, así como para geles homogéneos (una sola fase). Parece posible, por lo tanto, que la capacidad de los polisacáridos no gelificantes para promover la agregación de proteínas de suero desnaturalizadas térmicamente puede explicar los cambios observados en los módulos, tanto en el presente trabajo y en los estudios citados anteriormente.

4.2.8. Propiedades mecánicas de geles WPI/DX (sistemas mixtos y conjugados DX 6, 40 y 70 kDa)

El ensayo de Compresión Uniaxial realizado a geles mixtos y conjugados reveló que tienen comportamientos diferentes (igual que los resultados presentados en la Sección 4.1). En la **Figura 4.34**, se observa que los geles mixtos WPI/DX presentan punto de fractura, mientras que los conjugados no (**Figura 4.35**).

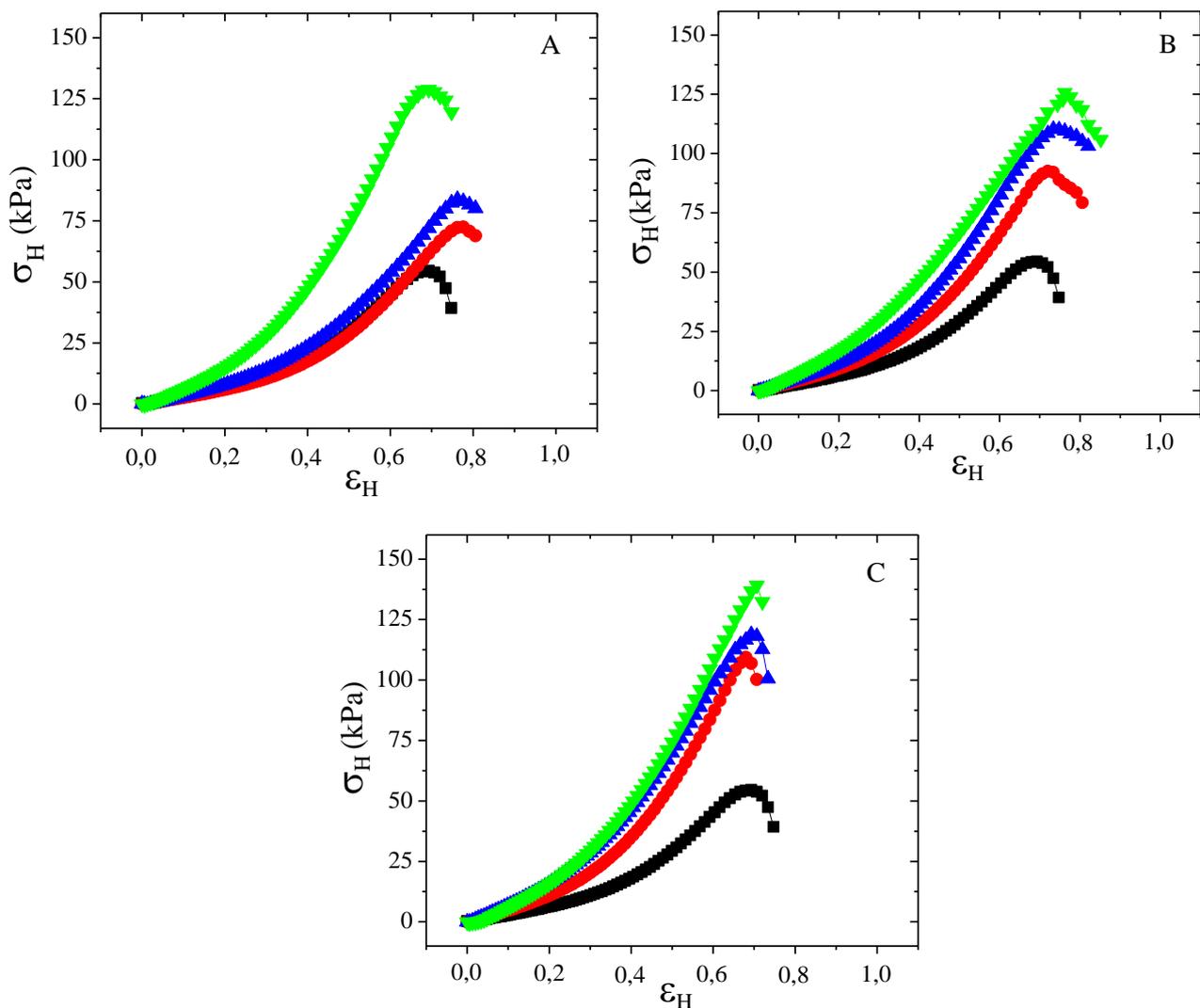


Figura 4.34. Esfuerzo vs Deformación de Hencky para geles WPI/DX mixtos con DX de 6(A), 40 (B) y 70 (C) kDa, a todas las concentraciones ensayadas: 0,0 (■), 3,6 (●), 7,2 (▲) y 10,8 (▼) % p/p de DX. (En todos los sistemas: 12% p/p WPI).

La **Figura 4.34 A, B y C**, muestra que la presencia de DX y el aumento en su concentración aumentan el esfuerzo máximo a la fractura.

Los geles conjugados retornaron a su forma original luego de la compresión sin romperse. En la **Figura 4.35 A** solo hay dos curvas, porque los geles WPI/DX conjugados con 7,2 y 10,8 % p/p no fueron autosostenibles, por lo que el ensayo no pudo ser realizado en estos dos sistemas.

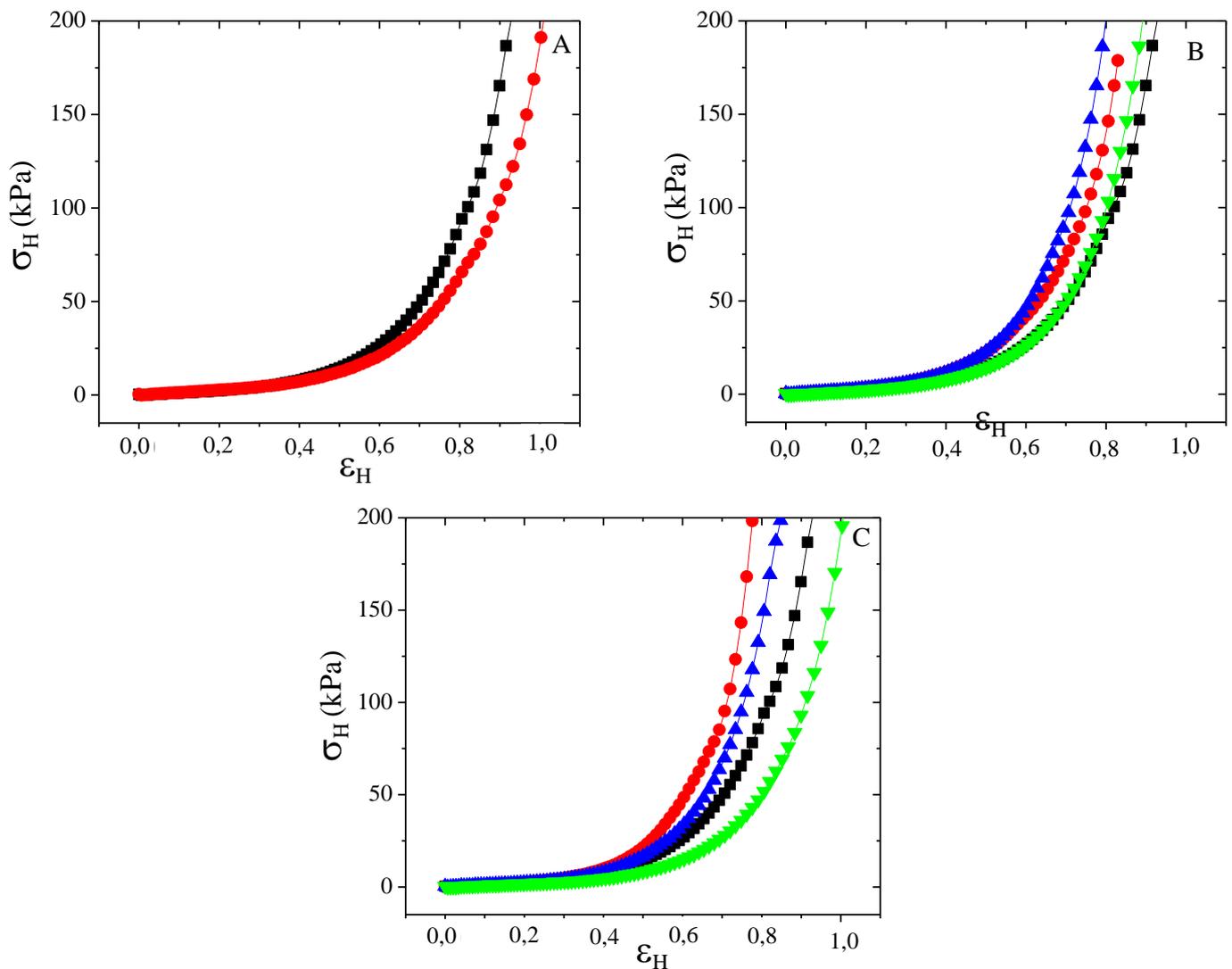


Figura 4.35. Esfuerzo vs Deformación de Hencky para geles WPI/DX conjugados con DX de 6(A), 40 (B) y 70 (C) kDa a todas las concentraciones ensayadas: 0,0 (■), 3,6 (●), 7,2 (▲) y 10,8 (▼) % p/p. (En todos los sistemas: 12% p/p WPI).

A partir de la **Figura 4.34 A, B, C y D** se obtuvieron los valores de los parámetros mecánicos a la fractura para los geles mixtos WPI/DX con DX de 6, 40 y 70 kDa, respectivamente. Estos se encuentran en la **Tabla 4.6**.

Tanto el peso molecular del dextrano como la concentración del mismo en la mezcla WPI/DX son factores que afectan de manera significativa el máximo esfuerzo (σ_M) y el trabajo realizado en la fractura (W_F) (**Tabla 4.6**). El σ_M aumenta bastante con la adición de DX al sistema, siendo este aumento proporcional a la cantidad de DX agregada. A medida que aumenta el PM de los DX este incremento es mayor. Hay un aumento de 2,5 veces el valor del σ_M entre el sistema de WPI al 12% y el sistema WPI/DX 70 kDa con la mayor concentración de DX. La misma tendencia se observa para el W_F .

Tabla 4.6. Parámetros mecánicos de geles de WPI y mixtos WPI/DX (DX de 6, 40 y 70 kDa).

| PM (kDa) | Conc. DX (% p/p) | σ_M (kPa) | ϵ_M | W_F | Def. Rupt. (%) |
|-------------|---------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | 0 | 58,4 ± 6,5 ^a | 0,71 ± 0,01 ^a | 15,6 ± 1,4 ^a | 50,83 ± 0,68 ^a |
| 6 kDa | 3,6 | 71,7 ± 6,2 ^a | 0,80 ± 0,03 ^a | 19,47 ± 1,84 ^a | 52,56 ± 1,44 ^a |
| | 7,2 | 94,7 ± 2,8 ^b | 0,81 ± 0,04 ^a | 29,87 ± 2,95 ^b | 54,78 ± 1,13 ^a |
| | 10,8 | 128,5 ± 5,0 ^c | 0,75 ± 0,03 ^a | 38,26 ± 2,87 ^b | 55,56 ± 1,73 ^a |
| | | | | | |
| 40 kDa | 3,6 | 92,5 ± 3,6 ^a | 0,77 ± 0,02 ^a | 25,34 ± 1,08 ^a | 52,66 ± 0,86 ^a |
| | 7,2 | 110,5 ± 3,9 ^b | 0,78 ± 0,04 ^a | 30,15 ± 3,21 ^b | 53,44 ± 1,10 ^a |
| | 10,8 | 125,3 ± 10,0 ^c | 0,75 ± 0,02 ^a | 38,51 ± 1,89 ^b | 53,83 ± 1,91 ^a |
| 70 kDa | 3,6 | 109,8 ± 2,4 ^a | 0,77 ± 0,05 ^a | 28,11 ± 1,44 ^a | 51,20 ± 1,87 ^a |
| | 7,2 | 118,7 ± 10,0 ^a | 0,67 ± 0,03 ^a | 37,91 ± 2,82 ^a | 53,49 ± 2,31 ^a |
| | 10,8 | 139,9 ± 3,7 ^a | 0,72 ± 0,04 ^a | 42,93 ± 2,06 ^b | 48,66 ± 1,47 ^a |

Los valores con las mismas letras no arrojaron diferencias significativas al aplicar la prueba de Duncan con $\alpha = 0,05$.

La máxima deformación de Hencky (ϵ_M) y la Deformación porcentual a la ruptura (Def. Rupt. %) no son afectadas ni por la concentración de DX, ni por su PM. Podemos observar que cuando la deformación llega al 50% aproximadamente, los geles mixtos empiezan a presentar fractura. La presencia de DX tiene una tendencia a aumentar ligeramente este parámetro, aunque no es significativa.

Con respecto al módulo de Young de geles mixtos (**Figura 4.36 A**), podemos observar que este parámetro aumenta tanto con la concentración de DX como con su PM, siendo más acentuado para la concentración de DX cuando el PM es bajo (6 kDa); cuando el PM es mayor, la concentración no influye tanto.

También se puede observar que en geles mixtos el módulo aumenta con el aumento en la concentración de DX. Resultados similares fueron encontrados por Fitzsimons et al. (2008) trabajando con goma Guar. Ellos encontraron que un aumento de goma Guar hasta 0.05% p/v provocó un incremento esencialmente lineal en el módulo de Young de geles de proteínas de suero.

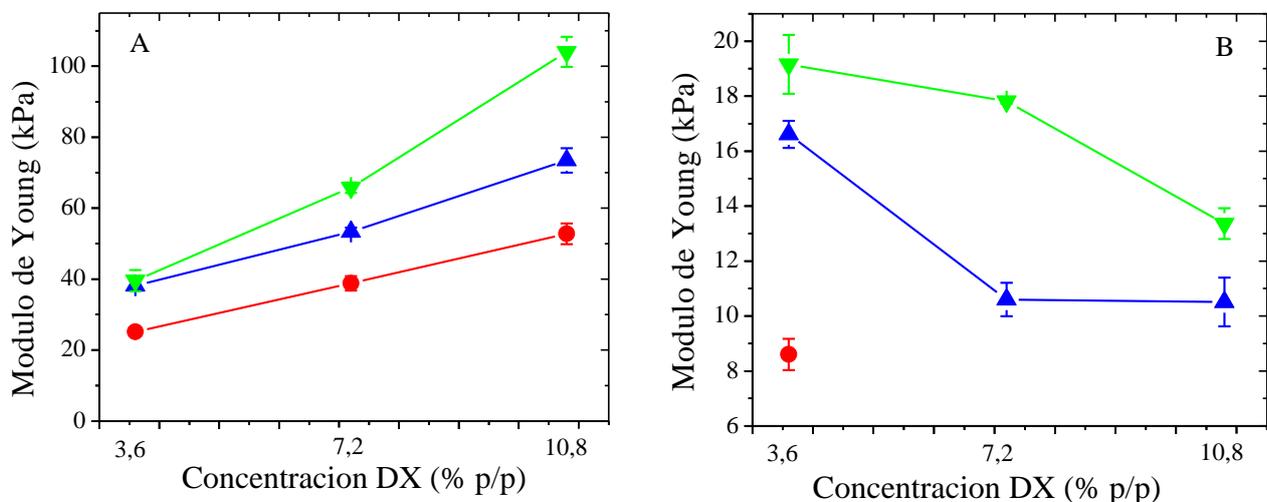


Figura 4.36. Módulo de Young de geles WPI/DX mixtos (A) y conjugados (B) con DX de 6 (●), 40 (▲) y 70 (▼) kDa según la concentración de DX.

Ya que los sistemas conjugados no presentaron fractura en las condiciones ensayadas, el único parámetro mecánico obtenido de la compresión uniaxial para estos geles fue el módulo de Young. El mismo se puede observar en la **Figura 4.36 B**. Los geles conjugados WPI/DX 5 días con agregado de 3,6 y 7,2 % p/p realizados con el DX de 6 kDa no fueron autosostenibles, por lo que no se le pudieron realizar los ensayos de compresión. Para este peso molecular solo se ensayó el gel con 3,6 % p/p de DX, por eso solo hay un punto para esta serie. Los demás dextrans de pesos moleculares 40 y 70 kDa, dieron geles autosostenibles en todas las concentraciones de DX.

Por lo observado en la **Figura 4.36 B**, podemos concluir que tanto la concentración como el peso molecular del DX influyen en este parámetro. A medida que el peso molecular aumenta, el módulo de Young es mayor (igual que en geles mixtos), pero si observamos los valores del módulo dentro de un mismo peso molecular, podemos observar que el módulo disminuye a medida que la concentración de DX aumenta. El módulo alcanza su menor valor para los sistemas con DX 6 kDa, que es el que más reacciona, por lo visto en los ensayos de grupos amino libres, color, absorbancia y fluorescencia. Mediante estos resultados podemos concluir que la reacción de Maillard disminuye el valor del módulo de Young, y debilita la fuerza de gel.

Comparando los valores del módulo de los geles WPI/DX mixtos y glicosilados podemos observar que el módulo es mucho mayor para los geles mixtos llegando a 110 kPa aproximadamente para el WPI con 10,8 % p/p de DX de 70 kDa, a diferencia de los módulos de geles conjugados, que llegan como máximo a 19 kPa, aproximadamente.

Estos resultados son opuestos a los observados en otros estudios donde trabajaron con soluciones de proteínas globulares (por ejemplo, lisozima, albúmina sérica bovina (ASB), soja) calentadas en presencia de azúcares reductores de bajo peso molecular (mono y disacáridos), tales como lactosa, ribosa, xilosa. En estos trabajos se observó la formación de

geles con una mayor fuerza a la ruptura en comparación con las muestras calentadas en ausencia de azúcares reductores (Armstrong, Hill, Schrooyen & Mitchell, 1994; Cabodevila, Hill., Armstrong, Sousa & Mitchell, 1994; Easa, Armstrong, Mitchell, Hill, Harding & Taylor, 1996a y Easa, Hill, Mitchell & Taylor, 1996b; Hill & Easa, 1998; Mitchell & Hill, 1995; Rich & Foegeding, 2000). En estos trabajos cuanto más reactivo era el azúcar reductor, según la clasificación de la reacción de Maillard (Labuza & Baisier, 1992; Martins, Jongen & van Boekel, 2001), mayor era la resistencia del gel, como así su color más oscuro.

En estos trabajos, la reacción de Maillard también disminuyó la concentración para que se produzca la gelificación. Por ejemplo, la cantidad mínima de ASB para formar un gel fue 7%, pero disminuyó a 1,2 o 0,5% mediante el agregado de 3% de xilosa o 3% de ribosa, respectivamente (Easa et al., 19963a). Además, se disminuyó el tiempo para la gelificación al aumentar la concentración de azúcar inicial. Por ejemplo, un gel de ASB al 3% y 2% de xilosa llevó 160 min su gelificación, mientras que con 4% de xilosa la gelificación duró 90 min (Easa et al., 1996a). En estos trabajos el aumento de la resistencia de gel fue atribuido a la unión covalente de las proteínas inducida por el azúcar (reticulación de proteínas).

En otros estudios se han centrado en la mejora de las propiedades de gelificación de proteínas globulares mediante reacción con azúcares reductores en estado “seco”, como se utilizó en la presente tesis. Matsudomi et al. (2002) mostraron que los geles al 10% p/v de proteínas de clara de huevo (CH) conjugadas con goma Guar hidrolizada (GG) (PM 15-20 kDa), obtenidos mediante incubación del sistema a través del método seco a humedad controlada (3 días a 60 °C con 65% de humedad relativa, en relación CH:GM 1:4), tuvieron mayor dureza. Del mismo modo, conjugados de proteína de suero y pectina obtenidos mediante el mismo método (15 días a 60 °C y 35-40% de humedad relativa), tuvieron geles con mayor dureza después calentar una solución acuosa del conjugado al 8% p/v de proteína 90 °C durante 10 minutos seguido por enfriamiento (6-8 °C, 24 h) (Mishra, Mann & Joshi,

2001). Otro trabajo donde se encontraron propiedades de fractura mejoradas (mayor esfuerzo y deformación a la fractura) con respecto a la proteína nativa, también mediante el método seco a humedad controlada, fue el realizado por Sun et al. (2004), donde trabajaron con ovoalbúmina conjugada con glucosa, fructosa y psicosa. Ellos encontraron que la psicosa fue la que más color marrón y fluorescencia desarrolló y esto se relacionó con mayor polimerización por cross-linking a través de la reacción de Maillard, y más esfuerzo a la fractura.

4.2.8.1. Tamaño de poro de geles WPI/DX (sistemas mixtos y conjugados DX 6, 40 y 70 kDa)

En la **Tabla 4.7** se encuentra el tamaño de poro de geles mixtos (calculados mediante la Ec. 8 de Materiales y Métodos).

En geles mixtos, el tamaño de poro de los geles varía más con la concentración que con el peso molecular de los dextranos. A mayor concentración y mayor peso molecular del polisacárido, menor es el tamaño de poro. Por otro lado, en los geles conjugados, el tamaño de poro aumenta cuando aumenta la concentración de DX y disminuye el PM del DX involucrado, indicando que el tamaño de poro aumenta a medida que la reacción de Maillard tiene lugar. Esto se relaciona con la menor fuerza de gel observada por el módulo de Young de los geles conjugados. Al tener un tamaño de poro mayor, la fuerza se distribuye de manera diferente en el gel.

El mayor tamaño de poro puede ser debido a que, cuando se produce la reacción (5 días a 60°C), se van formando agregados de proteínas por desnaturalización térmica, y van quedando ocluidos algunos sitios donde se encuentran los grupos sulfhidrilos (que son los

que producen la red de proteínas y la formación del gel), que perderían la oportunidad de generar puentes disulfuros intercatenarios.

Tabla 4.7. Tamaño de poro de geles WPI/DX mixtos y conjugados según peso molecular de los DX.

| PM (kDa) | Conc DX (%) | Tamaño poro (nm) | |
|-------------|-------------|---------------------------|------------------|
| | | Geles mixtos | Geles conjugados |
| 6 | 0 | 73,9 ± 1,94 ^a | 101,82 ± 4,18 |
| | 3,60 | 78,86 ± 1,40 ^a | 112,67 ± 2,61 |
| | 7,20 | 68,22 ± 1,19 ^b | --- |
| | 10,8 | 61,70 ± 1,14 ^c | --- |
| 40 | 3,60 | 68,55 ± 0,76 ^b | 90,28 ± 0,89 |
| | 7,20 | 61,19 ± 0,45 ^c | 105,30 ± 0,12 |
| | 10,8 | 55,10 ± 0,84 ^d | 105,03 ± 4,69 |
| 70 | 3,60 | 67,99 ± 1,62 ^b | 86,19 ± 1,59 |
| | 7,20 | 57,09 ± 0,44 ^d | 88,20 ± 0,13 |
| | 10,8 | 49,06 ± 0,67 ^e | 97,10 ± 1,35 |

Los valores con las mismas letras no arrojaron diferencias significativas al aplicar la prueba de Duncan con $\alpha = 0,05$.

4.2.9. Microscopía Láser Confocal de Barrido de geles WPI/DX mixtos y conjugados (DX 6, 40 y 70 kDa)

La microestructura de los geles de WPI y WPI/DX mixtos y conjugados con 7,2 % p/p de DX adicionado, se pueden observar en la **Figura 4.37**. El marcado de las proteínas con Rodamina B permitió la identificación de las proteínas. En la **Figura 4.37 A** se muestra el gel de WPI (12 % p/p) donde la red de proteínas no puede ser observada (igual resultado que en Sección 4.1). Hay que recordar que según los cálculos de tamaño de poro, el gel de WPI al 12

% p/p tiene un tamaño de poro de 73,9 nm y la resolución máxima del microscopio es aproximadamente 200 nm.

Las imágenes de los geles WPI/DX mixtos y conjugados teñidos de forma no covalente con Rodamina B (**Figura 4.37 B y C**, respectivamente) son iguales a la imagen del gel de WPI (**Figura 4.37 A**).

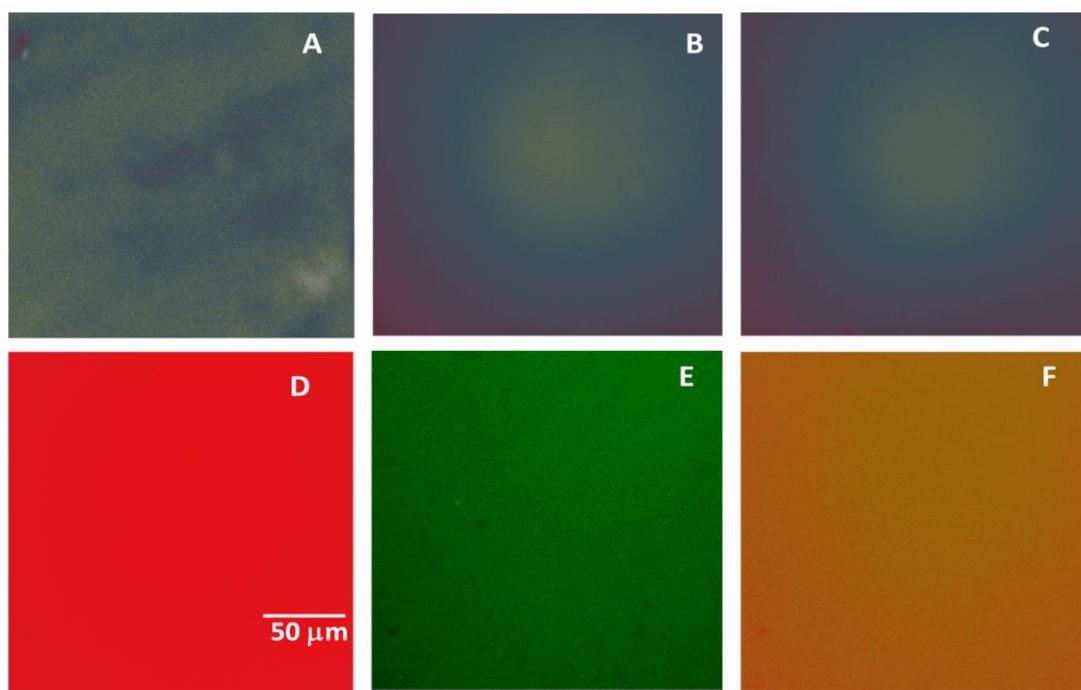


Figura 4.37. Imágenes obtenidas mediante Microscopía Laser Confocal de Barrido de geles de WPI (A), mixto WPI/DX (40 kDa) (B), conjugado WPI/DX (40 kDa) (C), todos ellos marcados de forma no covalente con Rodamina B; y gel mixto WPI/DX40 con WPI marcado de forma no covalente con Rodamina B (D) y DX marcado de forma covalente con FITC (E) y su imagen superpuesta (F).

En la parte inferior de la **Figura 4.37** se encuentra un gel mixto donde el WPI fue teñido de forma no covalente con Rodamina B (rosado, parte D) y el DX fue marcado

covalentemente con FITC (verde, parte E). La parte F es la imagen superpuesta de las micrografías D y E. La presencia de polisacárido (**Figura 4.37 E**) se observa como una fase continua sin interrupciones, tal que la separación de fases en el rango de concentraciones estudiadas no fue observada. Como se dijo en la Sección 4.1, esto puede ser debido a los pesos moleculares de los DX usados en la presente tesis (Monteiro et al. 2005).

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Se pudieron obtener conjugados de proteínas de suero (WPI) y dextranos (DX) a todos los tiempos de reacción (2, 5 y 9 días con DX 15-25 kDa), y a todos los pesos moleculares estudiados (DX de 6, 40 y 70 kDa) a varias concentraciones de DX.

El aumento de la concentración de DX y en los días de reacción, así como una disminución del peso molecular, tuvieron un efecto positivo en el progreso de la reacción.

Los métodos empleados para caracterizar los productos de la reacción de Maillard (PRM) permitieron conocer que el avance de la reacción se dio hasta los productos tardíos de la misma, que son polímeros coloreados de alto peso molecular.

La reacción de Maillard afectó en gran medida la propiedad gelificante de los sistemas WPI/DX. No solo aumentó el tiempo y la temperatura necesaria para la gelificación, sino que los geles obtenidos fueron más débiles que los correspondientes mixtos. A medida que la reacción tuvo mayor progreso, los geles mostraron una fuerza de gel menor, a tal punto de impedir la gelificación en los dos sistemas donde la reacción se produjo en mayor medida. Otra característica es que los geles conjugados no presentaron fractura en las condiciones de ensayo (80% de deformación).

El debilitamiento de la fuerza de gel de los geles conjugados podría estar atribuido a varios factores. Por un lado, las interacciones hidrofóbicas y los puentes disulfuro, que son muy importantes en la gelificación de proteínas globulares, podrían estar impedidos estéricamente por los polímeros producidos en las etapas más avanzadas de la reacción de Maillard. Otro factor que se encuentra en la literatura y que podría influir es la desnaturalización parcial producida por la incubación y por la unión del polisacárido, donde se podrían formar agregados que apantallarían los grupos sulfhidrilos que constituyen los puentes disulfuro que conforman la red del gel, y los demás grupos que contribuyen los enlaces no covalentes.

Las causas por las cuales no se produce la fractura en geles conjugados no están del todo esclarecidas. En estos geles, además de las interacciones comunes entre moléculas proteicas encontradas en geles mixtos, hay enlaces covalentes entre grupos amino de las proteínas y carbonilo del DX, y están presentes productos de la reacción, siendo algunos de ellos polímeros derivados de las etapas avanzadas de la misma. Tal vez todo este conjunto de enlaces covalentes y no covalentes son los responsables de mantener unida la estructura de gel, y así prevenir la fractura.

Estas características fueron muy diferentes a los geles mixtos correspondientes, en los cuales el esfuerzo máximo a la fractura se incrementó con la concentración de DX y con el aumento en su peso molecular. Por lo tanto, se pudo comprobar que los dextranos adicionados sin unión glicosídica a las proteínas tiene un efecto potenciador de las propiedades mecánicas de los geles, y a mayor peso molecular y mayor concentración, la fuerza de gel aumenta, pero cuando la reacción tiene lugar este efecto se revierte.

Probablemente el mecanismo por el cual los geles mixtos aumentan la fuerza de gel sea debido a una segregación de fases producida por incompatibilidad termodinámica y por un aumento en la agregación de las proteínas debido a la presencia de los DX, aunque esto no pudo ser corroborado mediante microscopía confocal.

Estos resultados muestran que es posible obtener sistemas con propiedades gelificantes totalmente diferentes, al aplicar una reacción que se produce espontáneamente en condiciones adecuadas y que es segura desde el punto de vista alimentario.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abtahi, S., & Aminlari, M. (1997). Effect of Sodium Bisulfate, Cysteine, and pH on Protein Solubility and Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis of Soybean Milk Base. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4768-4772.
- Adhikari, H. R. (1973). Fluorescent Products in a Glucose-Glycine Browning Reaction. *Journal of Food Science.*, 85, 486-488.
- Aguilera, J. M. (1995). Gelation of whey proteins. *Food Technology*, 49, 83-89.
- Ajandouz, E. H., Tchiakpe, L.S., Dalle Ore, F. Benajiba, A., & Puigserver A. (2001). Effects of pH on Caramelization and Maillard Reaction Kinetics in Fructose-Lysine Model Systems. *Journal of Food Science, Food Chemistry And Toxicology*, 66 (7), 926-931.
- Akhtar, M., & Dickinson, E. (2007). Whey Protein-Maltodextrin Conjugates as Emulsifying Agents, an Alternative to Gum Arabic. *Food Hydrocolloids* 21(4), 607-616.
- Aklonis, J., Mac Knight, W., & Shen, M. (1972). "Introduction to Polymer Viscoelasticity", Wiley-Interscience, Estados Unidos.
- Albani, J. R. (2004). "Structure and Dynamics of Macromolecules: Absorption and Fluorescence Studies". Paris, Elsevier.
- Alevisopoulos, S., Kasapis, S. & Abeysekera, R. (1996). Formation of Kinetically Trapped Gels in the Maltodextrin-Gelatin System. *Carbohydrate Research*, 293 (1), 79-99.
- Alting, A. C. (2003). Cold Gelation of Globular Proteins. Ph. D. Thesis. The Netherlands, Wageningen University.
- Alting, A. C., Hamer, R. J., de Kruif, C. G., & Visschers, R. W. (2000). Formation of Disulfide Bonds in Acid-Induced Gels of Preheated Whey Protein Isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5001-5007.

- Arce, C. B., Pilosof, A. M. R., & Bartholomai, G. B. (1991). Sodium Dodecyl Sulfate and Sulfite Improved Some Functional Properties of Soy Protein Concentrates. *Journal of Food Science*, 56, 113-115.
- Archibald, A. (2008). La proteína concentrada del suero de leche una súper estrella en la nutrición. U. S. Dairy. Disponible en: <http://www.pumpingironmag.org>
- Armstrong, H. J., Hill, S. E., Schrooyen, P., & Mitchell, J. R. (1994). A Comparison of the Viscoelastic Properties of Conventional and Maillard Protein Gels. *Journal of Texture Studies*, 25, 285-298.
- Avanza, M. V., Puppo, M. C., & Añón, M.C. (2005). Rheological Characterization of Amaranth Protein Gels. *Food Hydrocolloids*, 19, 889-898.
- Babiker, E. (2002). Effect of Chitosan Conjugation on the Functional Properties and Bactericidal Activity of Gluten Peptides. *Food Chemistry*, 79, 367-372.
- Badui, S. (1999). “Química de los Alimentos”, 3ed. México: Alambra Mexicana.
- Baeza, R. I., & Pilosof, A. M. R. (2002). Calorimetric Studies of Thermal Denaturation of β -Lactoglobulin in the Presence of Polysaccharides. *LWT - Food Science and Technology*, 35, 393-399.
- Baeza, R., & Pilosof, A. (2001). Mixed Biopolymer Gels Systems of β -lactoglobulin and Non-gelling Gum. En E. Dickinson, R Miller (Eds.), *Foods colloids-fundamentals of formulation* (pags. 392-403) Cambridge, The Royal Society of Chemistry.
- Baeza, R., Gugliota, L., & Pilosof, A. (2003). Gelation of β -lactoglobulin in the presence of propylene glycol alginate, Kinetics and gel properties. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*, 31, 81-93.
- Baisier, W., & Labuza, T. P. (1992). Maillard Browning Kinetics in a Liquid Model System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40 (5), 708-713.

- Beaulieu, M., Turgeon, S. L., & Doublier, J. L. (2001). Rheology, Texture and Microstructure of Whey Proteins/Low Methoxyl Pectins Mixed Gels with Added Calcium. *International Dairy Journal*, 11, 961-967.
- Belder, A. N. (2003). Dextran, Handbook. Amersham Biosciences.
- Bernardi, L. S., Pilosof, A. M. R., & Bartholomai, G. B. (1991). Enzymatic Modification of Soy Protein Concentrates by Fungal and Bacterial Proteases. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, 68, 102-105.
- Bertrand, M. E., & Turgeon, S. L. (2007). Improved Gelling Properties of Whey Protein Isolate by Addition of Xanthan Gum. *Food Hydrocolloids*, 21 (2), 159-166.
- Bhattacharjee, C., & Das, K. P. (2000). Thermal Unfolding and Refolding of β -lactoglobulin. An Intrinsic and Extrinsic Fluorescence Study. *European Journal of Biochemistry*, 267 (13), 3957-3964.
- Blanka, I., Davidekb, T., Devauda, S. & Cletyb, N. (2002). Analysis of Amadori Compounds by High Performance Union Exchange Chromatography Pulse Amperometric Detection. *International congress series*, 1245, 263-267.
- Blecker, C., Paquot, M., Lamberti, I., Sensidone, A., Lognay, G., & Deroanne, C. (1997). Improved Emulsifying and Foaming of Whey Proteins After Enzymatic Fat Hydrolysis. *Journal of Food Science*, 61, 48-52.
- Bohinski, R. C. (1978). "Bioquímica". Ed. Fondo educativo interamericano, Estados Unidos.
- Bollag, D. M., & Edelstein, S. J. (1991). Gel Electrophoresis under Denaturing Conditions. En, D. M. Bollag, & S. J. Edelstein, "*Protein Methods*". Estados Unidos:Wiley-Liss, Inc.
- Boye, J.I., Ma, C,-Y., & Harwalkar, V.R. (1997). Thermal Denaturation and Coagulation of Proteins. En S. Damadoran & A. Paraf. "*Food proteins and their applications*". Nueva York: Marcel Dekker Inc.

- Brew, K., Castellino, F., Vanaman, T. C., & Hill, R. (1970). The Complete Amino Sequence of Bovine α -lactalbumin. *The Journal of Biological Chemistry*, 245-4570.
- Broersen, K., Elshof, M., De Groot, J., Voragen, A., Hamer, R., & de Jongh, J. (2007). Aggregation of β -Lactoglobulin Regulated by Glucosylation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 2431-2437.
- Broersen, K., Voragen, A. G. J., Hamer, R. J., & de Jongh, H. H. J. (2004). Glycoforms of β -lactoglobulin with Improved Thermostability and Preserved Structural Packing. *Biotechnology and Bioengineering*, 86, 78-87.
- Brownsey, G. J., Morris, V. J. (1988). Mixed and Filled Gels, Models for Foods. En J. M. V. Blanshard, & J. R. Mitchell (Eds.), *Food structure, Its Interaction and Evaluation* (Págs. 7-23). London, Elsevier Applied Science.
- Bryant, C. M., & Mc Clements, D. J. (1998). Molecular Basis of Protein Functionality with Special Consideration of Cold-Set Gels Derived from Heat-Denatured Whey. *Food Science and Technology*, 9, 143-151.
- Bryant, C. M., & McClements, D. J. (2000). Influence of Xanthan Gum on Physical Characteristics of Heat-Denatured Whey Protein Solutions and Gels. *Food Hydrocolloids*, 14, 383-390.
- Burton, H. S., Mc Weeny, D. J., Panhi, P. N., & Biltcliffe, D. O. (1962). Fluorescent Compounds and Non-Enzymatic Browning. *Nature*, 98, 4858, 948-950.
- Cabodevila, O., Hill, S.E., Armstrong, H.J., Sousa, I., & Mitchell, J.R. (1994). Gelation Enhancement of Soy Protein Isolate Using the Maillard Reaction and High Temperatures. *Journal of Food Science*, 59, 872-875.
- Cairolí, S., Iametti, S., & Bonomi, F. (1994). Reversible and Irreversible Modifications of β -lactoglobulin Upon Exposure to Heat. *Journal of Protein Chemistry*, 13, 347-354.

- Capron, I., Nicolai, T., & Durand, D. (1999). Heat Induced Aggregation and Gelation of β -lactoglobulin in the Presence of κ -Carrageenan. *Food Hydrocolloids*, 13 (1), 1-5.
- Carp, D. J., Bartholomai, G. B., & Pilosof, A. M. R. (1999). Electrophoretic Studies for Determining Soy Proteins–Xanthan Gum Interactions in Foams. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, 12 (3-6), 309-316.
- Cayot, P., & Lorient, D. (1996). Structure-function relationship of whey proteins. En, S. Damodaran, & A. Paraf, “*Food Proteins and their applications*”. Nueva York: Marcel Dekker.
- Chawla, S. P., Chander, R., & Sharma, A. (2009). Antioxidant Properties of Maillard Reaction Products Obtained by Gamma-Irradiation of Whey Proteins. *Food Chemistry*, 116, 122-128.
- Cheftel, J. C., (1977) Chemical and Nutritionl Modification of Food Proteins Due to Processing and Storage. En “*Food proteins*”, Ed: J. R. Whitaker & S. R. Tannebaum. Wesport: AVI.
- Cheftel, J. C., Cuq, J. L., & Lorient, D. (1989). Modificaciones de las Proteínas. En “*Proteínas Alimentarias. Bioquímica. Propiedades Funcionales. Valor Nutritivo. Modificaciones Químicas*”. Zaragoza: ACRIBIA S.A.
- Chen, S., -L., Yang, D.,-J., Chen , H., -Y., & Liu, S., -C. (2009). Effect of Hot Acidic Fructose Solution on Caramelisation Intermediates Including Colour, Hydroxymethylfurfural and Antioxidative Activity Changes. *Food Chemistry*, 114, 582-588.
- Chevalier, F., Chobert, J.-M., Genot, C., & Haertlé, T. (2001). Scavenging of Free Radicals, Antimicrobial and Cytotoxic Activities of the Maillard Reaction Products of β -lactoglobulin Glycated with Several Sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5031-5038.

- Chobert, J.-M., Gaudin, J.-C., Dalgalarondo, M., & Haertlé, T. (2006). Impact of Maillard Type Glycation on Properties of β -lactoglobulin. *Biotechnology Advances*, 24 (6), 629-632.
- CIE (1979). "Colorimetry". Bureau Paris: CIE Publication.
- Clark, A. H. (1992). Gels and gelling. En "Physical chemistry of foods", Eds: H. G. Schwartzberg, & R. W. Hartel. New York, Marcel Dekker.
- Clark, A. H., & Ross-Murphy, S. B. (1987). Structural and Mechanical Properties of Biopolymer Gels. *Advances in Polymer Science*, 83, 57-192.
- Clark, A. H., Judge, F. J., Richards, J. B., Stubbs, J. M., & Suggett, M. (1981). Electron Microscopy of Networks Structures in Thermally-Induced Globular Proteins Gels. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 17, 380-386.
- Class, S. D., Dalton, C. R., & Hancock, B. C. (1999). Differential Scanning Calorimetry, Applications in Drug Development. *Pharmacology Science and Technology Today*, 2(8), 311-319.
- Creighton, T. E. (1978). Experimental Studies of Protein Folding and Unfolding. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 33, 231-297.
- Damodaran, S. (1997). Food Protein, an Overview. En, S. Damodaran, & A. Paraf, "Food Proteins and Their Applications". New York, Marcel Dekker.
- Darewicz, M., & Dziuba, J. (2001). The Effect of Glycosylation on Emulsifying and Structural Properties of β -casein. *Nahrung*, 45, 15-20.
- De Gennes, P. G. (1979). *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Ithaca, New York: Cornell University Press.
- de Jong, S., & van de Velde, F. (2007). Charge Density of Polysaccharide Controls Microstructure and Large Deformation Properties of Mixed Gels. *Food Hydrocolloids*, 21, 1172-1187.

- de Jong, S., Klok, H. J., & van de Velde, F. (2009). The Mechanism Behind Microstructure Formation in Mixed Whey Protein–Polysaccharide Cold-Set Gels. *Food Hydrocolloids*, 23, 755-764.
- de Wit, J. N. (1998). Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. *Journal of Dairy Science*, 81, 597-608.
- de Wit, J. N., & Klarenbeek, G. (1984). Effects of Heat Treatments on Structure and Solubility of Whey Proteins. *Journal of Dairy Science*, 67, 2701-2710.
- Dickinson, E. (1993). Protein-Polysaccharide Interactions in Food Colloids. En E. Dickinson, & P. Walstra, “*Food Colloids and Polymers, Stability and Mechanical Properties*”. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Dickinson, E., & Galazka, V.B. (1991). Emulsion Stabilization by Ionic and Covalent Complexes of β -lactoglobulin with Polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 5, 281–296.
- Dickinson, E., & Izgi, E. (1996). Foam Stabilization by Protein-Polysaccharide Complexes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 113, 191-201.
- Diftis, N., & Kiosseoglou, V. (2003). Improvement of Emulsifying Properties of Soybean Protein Isolate by conjugation with Carboxymethyl Cellulose. *Food Chemistry*, 81, 1-6.
- Doi, E. (1993). Gels and Gelling of Globular Proteins. *Trends in Food Science and technology*, 4, 1-5.
- Doi, E., & Kitabatake, N. Structure and Functionality of Egg Protein. En “*Food proteins and their applications*”. Eds: S. Damadoran & A. Paraf. Nueva York: Marcel Dekker Inc.
- Donato, L., Garnier, C., Novales, B., Durand, S., & Doublier, J. L. (2005). Heat Induced Gelation of Bovine Serum Albumin/Low-Methoxyl Pectin Systems and the Effect of Calcium Ions. *Biomacromolecules*, 6, 374-385.

- Doublier, J. L., Garnier, C., Renard, D., & Sanchez, C. (2000). Protein-Polysaccharide Interactions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 5, 202-214
- Dunlap, C. A., & Côte', G. L. (2005). β -lactoglobulin–Dextran Conjugates, Effect of Polysaccharide Size on Emulsion Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 419-423.
- Easa, A. M., Armstrong, H. J., Mitchell, J. R., Hill, S. E., Harding, S. E., & Taylor, A. J. (1996a). Maillard Induced Complexes of Bovine Serum Albumin: a Dilute Solution Study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 18, 297-301.
- Easa, A. M., Hill, S. E., Mitchell, J. R., & Taylor, A. J. (1996b). Bovine Serum Albumin Gelation as a Result of the Maillard Reaction. *Food Hydrocolloids*, 10, 199-202.
- Einhorn-Stoll, U., Ulbrich, M., Sever, S., & Kunzek, H. (2005). Formation of Milk Protein Pectin Conjugates with Improved Emulsifying Properties by Controlled Dry Heating. *Food Hydrocolloids*, 19, 329-340.
- Ellis, G. P. (1959). The Maillard Reaction. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 14, 63-134
- Errington, A. D., & Foeding, A. (1998). Factors Determining Fracture Stress and Strain on Fine Stranded Whey Protein Gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2963-2967.
- Farroni, A., & Buera, M. P. (2012). Colour and Surface Fluorescence Development and Their Relationship with Maillard Reaction Markers as Influenced by Structural Changes During Cornflakes Production. *Food Chemistry*, 135, 1685-1691.
- Farroni, A., & Buera, M. P. (2012). Maillard Reaction Markers as Influenced by Structural Changes During Cornflakes Production. *Food Chemistry*, 135, 1685-1691.
- Feeney, R. E. (1977). Chemical Modification of Food Proteins. En "*Food proteins*". Eds: J. R. Whitaker & S. R. Tannebaum. Wesport: AVI.

- Fenaille, F., Morgan, F., Parisod, V., Tabet, J.-C., & Gu, P. A. (2004). Solid-State Glycation of β -lactoglobulin by Lactose and Galactose, Localization of the Modified Amino Acids Using Mass Spectrometric Techniques. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 16-28.
- Fitzsimons, S., Mulvihill, D., & Morris, E. (2008). Large Enhancements in Thermogelation of Whey Protein Isolate by Incorporation of Very Low Concentrations of Guar Gum. *Food hydrocolloids*, 22, 576-586.
- Flory, P. J. (1953). *Principles of Polymer Chemistry*. Ithaca, New York: Cornell University Press.
- Flory, P. J. (1974). Introductory Lecture. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 57, 7-18.
- Foegeding, E. A., Davis, J., Doucet, D., & McGuffey, M. (2002). Advances in Modifying and Understanding Whey Protein Functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 151-159.
- Foegeding, E. A. (2007). Rheology and Sensory Texture of Biopolymer Gels. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12, 242-250.
- Foegeding, E. A. (2010). Rheology, Structure and Texture. Perception in Food Proteins Gels. 3-15. En "Food Colloids: Interactions, Microstructure and Processing". Ed: Eric Dickinson. Gran Bretaña: Royal Society of Chemistry
- Fogliano, V., Monti, S. M., Musella, T., Randazzo, G., & Ritien, A., (1999). Formation of Coloured Maillard Reaction Products in a Gluten-Glucose Model System. *Food Chemistry*, 66, 293-299.
- Franzen, K. L., & Kinsella, J. E. (1976). Functional Properties of Succinylated and Acetylated Soy Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24, 788- 792.

- Galani, D., & Apenten, R. K. O. (1999). Heat-Induced Denaturation and Aggregation of β -lactoglobulin, Kinetics of Formation of Hydrophobic and Disulphide-Lined Aggregates. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 467-476.
- Ge, S-J., & Lee, T-C. (1996). Effective HPLC Method for the Determination of Aromatic Amadori Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1053-1057.
- Goloberg, T., Weijing, C., & Melpomeni, M. (2004). Advanced Glycoxidation End Products in Commonly Consumed Foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 104, 87-1291.
- Gonçalves, M. P., Torres, D, Andrade, C. T, Azero, E. G., & Lefebvre, M. (2004). Rheological Study of the Effect of *Cassia javanica* Galactomannans on the Heat-Set Gelation of a Whey Protein Isolate at pH 7. *Food Hydrocolloids*, 18, 181-189.
- Grinberg, Ya. V., & Tolstoguzov, V. B. (1997). Thermodynamic Incompatibility of Proteins and Polysaccharides in Solutions. *Food Hydrocolloids*, 11 (2), 145-158.
- Groubet, R., Chobert, J.-M., & Haertlé, T. (1999). Functional Properties of Milk Proteins Glycated in Mild Conditions. *Sciences des Aliments*, 19, 423-438
- Gu, F. -L., Kim, J. M., Abbas, S., Zhang, X. -M., Xia, S. -Q., & Chen, Z. -X. (2010). Structure and Antioxidant Activity of High Molecular Weight Maillard Reaction Products from Casein-Glucose. *Food Chemistry*, 120, 505-511.
- Ha, E., & Zemelb, M. (2003). Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids, mechanisms underlying health benefits for active people. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14 251-258.
- Hattori, M., Aiba, Y., Nagasawa, K., & Takahashi, K. (1996). Functional Improvement of Alginic Acid by Conjugating with β -lactoglobulin. *Journal of Food Science*, 61, 1171-1176.

- Hattori, M., Ametani, A., Katakura, Y., Shimizu, M., & Kaminogawa, S. (1993). Unfolding/Refolding Studies on Bovine β -Lactoglobulin with Monoclonal Antibodies as Probes; Does a Renatured Protein Completely Refold? *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 22414-22419.
- Hattori, M., Nagasawa, K., Ametani, A., Kaminogawa, S., & Takahashi, K. (1994). Functional Changes in β -lactoglobulin by Conjugation with Carboxymethyl Dextran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2120-2125.
- Hattori, M., Numamoto, K., Kobayashi, K., & Takahashi, K. (2000). Functional Changes in β -lactoglobulin by Conjugation with Cationic Saccharides. *Journal of Aricultural and Food Chemistry*, 48, 2050-2056.
- Hattori, M., Ogino, A., Nakai, H., Takahashi, K. (1997). Functional Improvement of b-lactoglobulin by Conjugating with Alginate Lyase-Lysate. *Journal of Aricultural and Food Chemistry*, 45, 703-708.
- Hermansson, A, -M. (1978). Physico-Chemical Aspects of Soy Protein Structure Formation. *Journal of Texture Studies*, 9, 33-58.
- Hill, S., & Easa, A.M. (1998). Linking Proteins Using the Maillard Reaction and the Implications for Food Processors. En: *"The Maillard Reaction in Foods and Medicine"*. Eds: J. O'Brien, H. E. Nursten, M. J. C Crabbe & J. M. Ames. Cambridge: Royal Chemistry Society.
- Hines, M. E., & Foegeding, E. A. (1993). Interactions of α -lactalbumin and Bovine Serum Albumin with β -lactoglobulin in Thermally Induced Gelation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41 (3), 341-346.
- Hoffmann, M. A. M., & van Mil, P. J. (1997). Heat-Induced Aggregation of β -lactoglobulin, Role of the Free Thiol Group and Disulfide Bonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2942-2948.

- Hoffmann, M. A. M., & van Mil, P. J. J. M. (1999). Heat Induced Aggregation of β -lactoglobulin as a Function of pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1898-1905.
- Hoffmann, M. A. M., Sala, G., Olieman, C., & de Kruif, K. G. (1997). Molecular Mass Distributions of Heat-Induced β -lactoglobulin Aggregates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2949-2957.
- Hofmann, T. (1998). Studies on the Relationship Between Molecular Weight and the Color Potency of Fractions Obtained by Thermal Treatment of Glucose/Amino Acid and Glucose/Protein Solution by Using Ultracentrifugation and Color Dilution Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3891-3895.
- Hudson, H. M., Daubert, C. R., & Foegeding, E. A. (2000). Rheological and Physical Properties of Derivatized Whey Protein Isolate Powders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (8), 3112-3119.
- Iametti, S., Cairoli, S., De Gregori, B., & Bonomi, F. (1995). Modifications of High-Order Structures Upon Heating of β -lactoglobulin, Depend on The Protein Concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 53-58.
- Iametti, S., De Gregori, B., Vecchio, G., & Bonomi, F. (1996). Modifications Occur at Different Structural Levels During the Heat Denaturation of β -lactoglobulin. *European Journal Biochemistry*, 237, 106-112.
- Ibrahim, H. R., Kobayashi, K. & Kato, A. (1993). Length of Hydrocarbon Chain and Antimicrobial Action to Gram-Negative Bacteria of Fatty Acylated Lysozyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41 (7), 1164-1168.
- Ikeda, S. (2003). Heat-Induced Gelation of Whey Proteins Observed by Rheology, Atomic Force Microscopy, and Raman Scattering Spectroscopy. *Food hydrocolloids*, 17, 399-406.

- Ikeda, S., & Foegeding, E. A. (1999). Dynamic Viscoelastic Properties of Thermally Induced Whey Protein Isolate Gels with Added Lecithin. *Food Hydrocolloids*, 13(3), 245-254.
- Ipsen, R., Otte, J., Dominguez, E., & Qvist, K. B. (2000). Gelation of Whey Protein Induced by Proteolysis or High Pressure Treatment. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55(2), 49-52.
- Jimenez-Castaño, L., López-Fandiño, R., Olano, A., & Villamiel, M. (2005). Study on β -lactoglobulin Glycosylation with Dextran, Effect on Solubility and Heat Stability. *Food Chemistry*, 93, 689-695
- Jimenez-Castaño, L., Villamiel, M., Lopez-Fandiño, R. (2007). Glicosilation of Individual Whey Proteins by Maillard Reaction Using Dextran of Different Molecular Mass. *Food Hydrocolloids*. 21, 433-443.
- Jimenez-Castaño, L., Villamiel, M., Martín-Alvarez, P. J., Olano, A., & López-Fandiño, R. (2005). Effect of the Dry-Heating Conditions on the Glycosylation of β -lactoglobulin with Dextran Through the Maillard Reaction. *Food Hydrocolloids*, 19, 831-837.
- Katayama, S., Shima, J., Saeki, H. (2002). Solubility Improvement of Shellfish Muscle Proteins by Reaction with Glucose and its Soluble State in Low-Ionic strength Medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4327-4332.
- Kato A. (2002). Industrial Applications of Maillard-Type Protein-Polysaccharide Conjugates. *Food Science and Technology*, 8, 193-199.
- Kato, A., Mifuru, R., Matsudomi, N., & Kobayashi, K. (1992). Functional Casein-Polysaccharide Conjugates Prepared by Controlled Dry Heating. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*, 56, 567-571.
- Kato, A., Shimokawa, K., & Kobayashi, K. (1993). Improvement of Emulsifying Properties of Egg White Proteins by the Attachment of Polysaccharide through Maillard Reaction in a Dry State. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 41, 540-543.

- Kato, Y., Sasaki, Y, Furuta, R., & Kobayashi, K. (1990). Functional Protein-Polisaccharide Conjugate Prepared by Controlled Dry-Heating of Ovoalbumin-Dextran Mixtures. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54, 107-112.
- Kavanagh, G. M., Clark, A. H., & Ross-Murphy, S. B. (2000). Heat-Induced Gelation of Globular Proteins, Part 3. Molecular Studies on Low pH α -lactoglobulin Gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28, 41-50.
- Kim, J. -S., & Lee, Y. -S. (2009). Antioxidant Activity of Maillard Reaction Products Derived from Aqueous Glucose/Glycine, Diglycine, and Triglycine Model Systems as a Function of Heating Time. *Food Chemistry*, 116 (1), 227-232.
- Labuza, T., & Braisier, W. (1992). The kinetics of non enzymatic browning. En "*Physical Chemistry of foods*". Estados Unidos: Academic Press.
- Laemli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lakkis, J., & Villota, R. (1992). Effect of Acylation on Substructural Properties of Protein, a Study using Fluorescence and Circular Dichroism. *Journal of Aricultural and Food Chemistry*, 40, 553-560.
- Lakowicz, J. R. (1999). "*Principles of Fluorescence Spectroscopy*" (2da. ed). New York: Kluwer Academic.
- Lamprecht, A., Schäfer, U. F., & Lehr, C. M. (2000). Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy, structure, capsule wall composition and encapsulation rate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 49, 1-9.
- Langton, M., & Hermansson, A. M. (1992). Fine-Stranded and Particulate Gels of β -lactoglobuline and Whey Protein at Varying pH. *Food Hydrocolloids*, 5, 523-539.

- Le Bon, C., Nicolai, T., & Durand, D. (1999). Growth and Structure of Aggregates of Heat Denatured β -lactoglobulin. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 451-465.
- Leclère, J., & Birlouez-Aragon, I. (2001). The Fluorescence of Advanced Maillard Products is a Good Indicator of Lysine Damage During Maillard Reaction. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49 (10), 4682-4687.
- Lee, C. M., Sherr, B., & Koh, Y. N. (1984). Evaluation of Kinetic Parameters for a Glucose-Lysine Maillard Reaction. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 32, 379-382.
- Lertittikul, W., Benjakul, S., & Tanaka, M. (2007). Characteristics and Antioxidative Activity of Maillard Reaction Products from a Porcine Plasma Protein-Glucose Model System as Influenced by pH. *Food Chemistry*, 100, 669-677.
- Li, J., Ould Eleya, M., & Gunasekaran, S. (2006). Gelation of Whey Protein and Xanthan Mixture, Effect of Heating Rate on Rheological Properties. *Food Hydrocolloids*, 20 (5), 678-686.
- Lopes da Silva, J. A., & Rao, A. M. (1999). Rheological Behavior of Food Gel Systems. En: *"Rheology of Fluid and Semisolid Foods Principles and Applications"*. Ed: A. M. Rao Maryland: Aspen Publishers, Inc.
- Lorén, N., & Hermansson, A-M. (2000). Phase Separation and Gel Formation in Kinetically Trapped Gelatin/Maltodextrin Gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27 (4), 249-262.
- Lund, M. N., Losen, K., Sorenson, J., & Skibsted, L. H. (2005). Kinetics and Mechanism of Lactosylation of α -lactalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2095-2102.

- Madureira, A., Pereira, C., Gomes, A., Pintado, M., & Malcasa, F. (2007). Bovine Whey Proteins: Overview on Their Main Biological Properties. *Food Research International*, 40, 1197-1211.
- Mangino, M. (1984). Physicochemical Aspects of Whey Proteins Functionality. *Journal of Dairy Science*, 67, 2711.
- Mangino, M. E. (1992). Gelation of Whey Protein Concentrates. *Food Technology*, 46, 114-119.
- Manzocco, L. & Maltini, E. (1999). Physical Changes Induced by the Maillard Reaction in a Glucose–Glycine Solution. *Food Research International*, 32 (4), 299-304.
- Martinez, M. J. (2010). Impacto de la Interacción entre β -lactoglobulina, Caseinoglicomacropéptido y Polisacáridos en Coloides Alimentarios. Tesis Doctoral. Argentina: Universidad de Buenos Aires.
- Martins, S. I., Jongen, W. M. F, & van Boekel, M. A. (2001). A Review of Maillard Reaction in Food and Implications to Kinetic Modelling. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 364-373.
- Matarella, N. L., Creamer, L. K., & Richardson, T. (1983). Amidation or sterification of bovine b-lactoglobulin to form positively charge protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31, 968-974.
- Matheis, G., Penner, M. H., Feeney, R. E., & Withaker, J., R. (1983). Phosphorylation of Casein and Lysozyme by Phosphorous Oxycloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31, 379-386.
- Matiacevich, S. (2008). Caracterización y fotoestabilidad de compuestos fluorescentes y pardos generados en reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Implicancia en la conservación de materiales orgánicos. Tesis Doctoral. Argentina: Universidad de Buenos Aires.

- Matiacevich, S. B., & Buera, M. P. (2006). A Critical Evaluation of Fluorescence as a Potential Marker for the Maillard Reaction. *Food Chemistry*, 95, 423-430.
- Matoba, T., Doi, E., & Yonezawa, D. (1980). Digestibility of Acetylated and Succinylated Proteins by Pepsin-Pancreatin and Some Intracellular Peptidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2323-2328.
- Matsudomi, N., Nakano, K., Soma, A., & 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.
- Mc Evoy, H., Ross-Murphy, S. B., & Clark, A. H. (1985). Large Deformations and Ultimate Properties of Biopolymer Gels: 1. Single Biopolymer Component Systems. *Polymer*, 26, 1483.
- Mc Kenzie, H. A. (1971). β -lactoglobulins. En: "Chemistry and Molecular Biology, Milk proteins". Ed: H. A. Mc Kenzie. New York: Academic Press.
- Mc Kenzie, H. A., & Sawyer, W. H. (1967). Effect of pH on β -lactoglobulin. *Nature*, 214, 1101-1104.
- Miller, A. G., & Gerrard, J. A. (2005). The Maillard Reaction and food Protein Crosslinking. *Progress in Food Biopolymer Research*, 1, 69-86.
- Miralles, B., Martinez-Rodriguez, A., Santiago, A., van de Lagemaat, J., & Heras, A. (2007). The Occurrence of a Maillard-Type Protein-Polysaccharide Reaction Between β -lactoglobulin and Chitosan. *Food Chemistry*, 100, 1071-1075.
- Mishra, S., Mann, B., & Joshi, V. K. (2001). Functional Improvement of Whey Protein Concentrate on Interaction with Pectin. *Food Hydrocolloids*, 15, 9-15.
- Mitchell, J.R., & Hill, S.E. (1995). The Use and Control of Chemical Reactions to Enhance the Functionality of Macromolecules in Heat-Processed Foods. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 219-24.

- Mleko, S., & Foegeding, E. A. (2000). pH Induced Aggregation and Weak Gel Formation of Whey Protein Polymers. *Journal of Food Science*, 65 (1), 139-143.
- Monteiro, S. R., Tavares, C., Evtuguin, D. V., Moreno, N., & Lopes da Silva, J. A. (2005). Influence of Galactomannans with Different Molecular Weights on the Gelation of Whey Proteins at Neutral pH. *Biomacromolecules*, 6, 3291-3299.
- Montejano, J. C., Hamann, D. D., & Lanier, T. C. (1985). Comparison of Two Instrumental Methods with Sensory Texture of Protein Gels. *Journal of Texture Studies*, 16, 403-424.
- Morr, C. V., Hoffmann, W., & Buchheim, W. (2003). Use of Applied Air Pressure to Improve the Baking Properties of Whey Protein Isolates in Angel Food Cakes. *LWT-Food Science and Technology*, 36, 83-90.
- Morr, C., & Ha, Y. W. (1993). Whey Protein Concentrates and Isolates, Processing and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 431-476.
- Morris, V. J. (1986). Multicomponent Gels. En “*Gums and Stabilisers for the Food Industry*”. Eds: G. O. Phillips, D. J. Wedlock & P. A. Williams. Londres: Elsevier.
- Morris, V. J. (1998). Gelation of Polysaccharides. En: “*Functional Properties of Food Macromolecules*”. Eds: S. E. Hill, D. A. Edward & J. R. Mitchel. Maryland: Aspen Publication.
- Morris, V., & Wilde, P., (1997). Interaction of Food Biopolymers. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 2, 567-572.
- Mulsow, B. B., Jacob, M. & Henle, T. (2009). Studies on the Impact of Glycation on the Denaturation of Whey Proteins. *Europe Food Research Technology*, 228, 643-649.
- Mulvihill, D. M., & Donovan, M. (1987). Whey Proteins and Their Thermal Denaturation. A Review. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 11, 43-75.

- Murakami, M., A. Shigeeda, K. Danjo, T. Yamaguchi, H. Takamura & Matoba, T. (2002). Radical-Scavenging Activity and Brightly Colored Pigments in the Early Stage of the Maillard Reaction. *Journal of Food Science*, 67, 93-96.
- Nagasawa, K., Ohgata, K., Takahashi, K., & Hattori, M. (1996). Role of Polysaccharide Content and Net Charge on the Emulsifying Properties of β -lactoglobulin-Carboximetyl Dextran Conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2583-2543.
- Nagasawa, K., Takahashi, K., & Hattori, M. (1996). Improved Emulsifying Properties of α -Lactoglobulin by Conjugating with Carboxymethyl-Dextran. *Food Hydrocolloids*, 10, 63-67.
- Nakamura, S., & Kato, A. (2000). Multi-Functional Biopolymer Prepared by Covalent Attachment of Galactomannan to Egg-White Proteins Through Naturally Occurring Maillard Reaction. *Nahrung*, 44 (3), 201-206.
- Nakamura, S., Kato, A., Kobayashi, K. (1991). New Antimicrobial Characteristics of Lysozyme-Dextran Conjugate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 647-650.
- Nakamura, S., Ogawa, M., Nakai, S., Kato, A., & Kitts, D. (1998). Antioxidant Activity of a Maillard-Type Phosvitin-Galactomannan Conjugate with Emulsifying Properties and Heat Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3958-3963.
- Ndi, E., Swanson, B., Barbosa-Canovas, G., & Luedecke, L. (1996). Rheology and Microstructure of β -lactoglobulin/Sodium Polypectate Gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 86-92.
- Oakenfull, D., Pearce, J., & Burley, R. W. (1997). Protein Gelation. En: *“Food protein and their applications”*. Eds: S. Damodaran & A. Paraf. New York: Marcel Dekker, Inc.

- Oliver , C. M., Melton, L. D., & Stanley, R. A. (2006). Creating Protein With Novel Functionality Via the Maillard Reaction. A Review. *Critical review in Food Science and Nutrition*, 46, 337-350.
- Olsson, C., Langton, M., & Hermansson, A. M. (2002). Dynamic Measurements of β -lactoglobulin Structures During Aggregation, Gel Formation and Gel Break-Up in Mixed Biopolymer Systems. *Food Hydrocolloids*, 16 (5), 477-488.
- Ordoñez Perda, J. A., Cambero Rodriguez, M. S., Fernandez Alvarez, L., García de Fernando Miguillón, G. D., de la Hoz Perales, L., & Selgas Certero, M. D. (1998). Carbohidratos. En: “*Tecnología de los alimentos volumen I. Componentes de los alimentos procesos*”. Ed: J. A. Ordoñez Pereda. Madrid: Sintesis S.A.
- Ould Eleya, M. M., & Turgeon, S. L. (2000). Rheology of κ -carrageenan and β -lactoglobulin Mixed Gels. *Food Hydrocolloids*, 14, 29-40.
- Overby, L. H., & Frost, D. V. (1951). The Effects of Heat on The Nutritive Value of Protein Hydrolysates with Dextrose. *Journal of nutrition*, 46, 539-550.
- Papiz, M., Sawyer, L, Eliopoulos, E., North, A, Findlay, J., Sivaprasadarao, R. Jones, T., Newcomer, M., & Kraulis (1986). The Structure of β -lactoglobulin and its Similarity To Plasma Retinol-Binding Proteins. *Nature*, 324-383.
- Paulsson, M., Hegg, P. O., & Castberg, H.B. (1985). Thermal Stability of Whey Proteins Studied by Differential Scanning Calorimetry. *Thermochimica Acta*, 95, 435-440.
- Pérez, O., Wargon, V., & Pilosof, A. (2006). Gelation and Structural Characteristics of Incompatible Whey Proteins/Hydroxypropylmethylcellulose Mixtures. *Food Hydrocolloids*. 20. 966-974.
- Pessen, H., Purcell, J., & Farrell H. (1985). Proton Relaxation Rates of Water in Dilute Solutions of β -lactoglobulin. Determination of Cross Relaxation and Correlation with

- Structural Changes by the Use of Two Genetic Variants of Self-Associating Globular Proteins. *Biochemica Biophysica Acta*, 828, 1-12.
- Piculell, L., & Lindman, B. (1992). Association and segregation in Aqueous Polymer/Polymer, Polymer/Surfactant, and Surfactant/Surfactant Mixtures, Similarities and Differences. *Advances in Colloid and Interface Science*, 41 (28), 149-178.
- Pilosof, A. M. R. (2000). Gelificación. En “*Caracterización funcional y estructural de proteínas*”. Eds: A. M. R. Pilosof & G. B. Bartolomai. Buenos Aires: Eudeba.
- Puski, G. (1975). Modification of Functional Properties of Soy Protein by Proteolytic Enzyme Treatment. *Cereal Chemistry*, 52, 655-664.
- Qi, X. L., Holt, C., McNulty, D., Clarke, D. T., Brownlow, S., & Jones, G. R. (1997). Effect of Temperature on the Secondary Structure of β -lactoglobulin at pH 6.7, as Determined by CD and IR Spectroscopy, a Test of the Molten Globule Hypothesis. *Biochemical Journal*, 324, 341-346.
- Relkin, P. (1994). Differential Scanning Calorimetry, a Useful Tool for Studying Protein Denaturation. *Thermochimica Acta*, 246, 371-386.
- Relkin, P. (1996). Thermal Unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and Bovine Serum Albumin. A Thermodynamic Approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36 (6), 565-601.
- Renard, D., Lefebvre, J., Griffin, M. C, & Griffin, W. G. (1998). Effects of pH and Salt Environment on the Association of β -lactoglobulin Revealed by Intrinsic Fluorescence Studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 22 (1), 41-49.
- Renkema, J. M. S., & Van Vliet, T. (2002). Heat-Induced Gel Formation by Soy Proteins at Neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1569-1573.

- Rich, L. M., & Foegeding, E. A. (2000). Effects of Sugars on Whey Protein Gelation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5046-5052.
- Rizzi, G. (2003). Free Radicals in the Maillard Reaction. *Food Reviews International*, 19, 375-395.
- Rodríguez Patino, J. M., Rodríguez Niño, M. R., & Carrera Sanchez, C. (2002). Propiedades Funcionales de Lípidos y Proteínas de Interés para la formulación de Dispersiones Alimentarias. En “*Proteínas y Polisacáridos como Ingredientes Funcionales*”. Eds: M. C. Añón & A. M. R. Pilosof. La Plata: Edulp.
- Rosenthal, A. J. (2001). Relación entre las Medidas Instrumentales y Sensoriales de la Textura de Alimentos. En “*Textura de los alimentos, Medida y percepción*”. Zaragoza: Acribia.
- Ross, Y., & Karel, M. (1991). Phase Transitions of Mixtures of Amorphous Polysaccharides and Sugars. *Biotechnology Progress*, 7, 49-53.
- Ross-Murphy, S. B. Rheology of Biopolymer Solutions and Gels. (1995). En “*New Physico-Chemical Techniques for the Characterization of Complex Food Systems*”. Ed: E. Dickinson. Glasgow: Blackie Academic & Professional.
- Royer, C. A. (1995). Approaches to Teaching Fluorescence Spectroscopy. *Biophysical Journal*, 68, 1191-1196.
- Rufian-Henares, J. A., Guerra-Hernández, E., & García-Villanova, B. (2002). Maillard Reaction in Enteral Formula Processing, Furosine, Loss of O-phthaldialdehyde Reactivity, and fluorescence. *Food Research International*, 35, 527-533.
- Saeki, H., & Inoue, K. (1997). Improved Solubility of Carp Myofibrillar Proteins in Low Ionic Strength Medium by Glycosylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3419-3422.

- Salou, P., Loubiere, P., & Pareilleux, A. (1994). Growth and Energetic of *Leuconostoc Oenos* During Cometabolism of Glucose with Citrate or Fructose. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 5, 1459-1466.
- Sánchez, V. E., Bartholomai, G. B., & Pilosof, A. M. R. (1995). Rheological Properties of Food Gums as Related to their Water Binding Capacity and to Soy Protein Interaction. *LWT - Food Science and Technology*, 28 (4), 380-385.
- Sato, R., Katayama, S, Sawabe, T, & 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.
- Sato, R., Sawabe,T., Kishimura, H., Hayashi, K., & Saeki, H. (2000). Preparation of Neoglycoprotein from Carp Myofibrillar Protein and Alginate Oligosaccharide, Improved Solubility in Low Ionic Strength Medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 17-21.
- Shepherd, R., Robertson, A., & Ofman, D. (2000). Dairy Glycoconjugate Emulsifiers, Casein-Maltodextrins. *Food Hydrocolloids*, 14, 281-286.
- Shu, Y. W., Sahara, S., Nakamura, S., & Kato, A. (1996). Effects of the Length of Polysaccharide Chains on the Functional Properties of the Maillard-Type Lysozyme-Polysaccharide Conjugate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2544-2548.
- Song, Y., Babiker, E., Usui, M., Saito, A., & Kato, A. (2002). Emulsifying Properties and Bactericidal Action of Chitosan-Lysozyme Conjugates. *Food Research International*, 35, 459-466.

- Spahn, G., Baeza, R., Santiago, L., & Pilosof, A. (2008). Whey Protein Concentrate/ λ -Carrageenan Systems, Effect of Processing Parameters on the Dynamic of Gelation and Gel Properties. *Food Hydrocolloids*, 22, 1504-1512.
- Spotti, M. J., Santiago, L. G., Rubiolo, A. C., & Carrara, C. R. (2012). Mechanical and Microstructural Properties of Milk Whey Protein/Espina Corona Gum Mixed Gels. *LWT - Food Science and Technology*, 48, 69-74.
- Stading, M., & Hermansson, A. M. (1990). Viscoelastic Behaviour of β -lactoglobulin Structures. *Food Hydrocolloids*, 4 (2), 121-135.
- Stading, M., & Hermansson, A. M. (1991). Large Deformation Properties of β -lactoglobulin Gel Structures. *Food Hydrocolloids*, 5(4), 339-352.
- Stading, M., & Hermansson, A. M. (1992). Inhomogeneous fine-stranded β -lactoglobulin Gels. *Food Hydrocolloids*, 5, 455-470.
- Steffe, J. F. (1992). Viscoelasticity, en “*Rheological Methods in Food Process Engineering*” Estados Unidos: Freeman Press.
- Sun W., Yu S., Yang X., Wang J., Zhang J., Zhang Y., & Zheng E. (2011). Study on the Rheological Properties of Heat-Induced Whey Protein Isolate-Dextran Conjugate Gel. *Food Research International*, 44, 3259-3263.
- Sun Y., Hayakawa S., Puangmanee S., & Izumori K. (2006). Chemical Properties and Antioxidative Activity of Glycated α -lactalbumin with a Rare Sugar: D-allose, by Maillard Reaction. *Food Chemistry*, 95, 509-517.
- Sun, Y., Hayakawa, S., & Izumori, K. (2004). Modification of Ovalbumin with a Rare Keto-Hexose through the Maillard Reaction, Effect on Protein Structure and Gel Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1293-1299.
- Syrbe, A., Fernandes, P. B., Dannenberg, F., Bauer, W., & Klostermeyer, H. (1995). Whey Protein and Polysaccharide Mixtures, Polymer Incompatibility and its Applications.

- En: *“Food Colloids and Macromolecules”*. Eds: E. Dickenson & D. Lorient. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Takahashi, K., Lou, X.-F., Ishii, Y., & Hattori, M. (2000). Lysozyme-glucose Stearic Acid Monoester Conjugate Formed through the Maillard Reaction as an Antibacterial Emulsifier. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2044-2049.
- Tavares, C., & Lopes da Silva, J. A. (2003). Rheology of Galactomannan–Whey Protein Mixed Systems. *International Dairy Journal*, 13, 699-706.
- Tavares, C., Monteiro, S. R., Moreno, N. & Lopes da Silva, J. A. (2005) Does the Branching Degree of Galactomannans Influence their Effect on Whey Protein Gelation? *Colloids and Surfaces A, Physicochemical and Engineering Aspects*, 270-271, 213-219.
- Tolstoguzov, V. B. (1986). Functional Properties of Protein-Polysaccharides Mixtures. En: *“Functional Properties of Food Macromolecules”*. Eds: J. R. Mitchell & D. A. Ledward. Londres: Elsevier Applied Science.
- Tolstoguzov, V. B. (1991). Functional Properties of Food Proteins and Role of Protein-Polysaccharide Interaction. *Food Hydrocolloids*, 4 (6), 429-468.
- Tolstoguzov, V. B. (1995). Some Physico-Chemical Aspects of Protein Processing in Foods. Multicomponent Gels. *Food Hydrocolloids*, 9 (4), 317-332.
- Tolstoguzov, V. B. (1997). Protein-Polysaccharide Interactions. En: *“Food proteins and their applications”*. Eds: S. Damodaran & A. Paraf. Nueva York: Marcel Decker, Inc.
- Tolstoguzov, V. B. (2000). Compositions and Phase Diagrams for Aqueous Systems Based on Proteins and Polysaccharides. En: *“Microcompartmentation and Phase Separation in Cytoplasm”*. Eds: H. Walter, D. E. Brooks, & P. A. Sreere. San Diego: Academic Press.
- Tombs, M. P. (1974). Gelation of Lobular Proteins. *Discussion of the Faraday Society*, 57, 158-164.

- Tromp, R. H., van de Velde F, van Riel J., & Paques, M. (2001). Confocal Scanning Light Microscopy (CSLM) on Mixtures of Gelatine and Polysaccharides. *Food Research International*, 34, 931-938.
- Turgeon, S. L., & Beaulieu, M. (2001). Improvement and Modification of Whey Protein Gel Texture Using Polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 15, 583-591.
- Turgeon, S. L., Beaulieu, M., Schmitt, C., & Sanchez, C. (2003). Protein–Polysaccharide Interactions, Phase-Ordering Kinetics, Thermodynamic and Structural Aspects. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 8(4-5), 401-414.
- van Boekel, M. A. J. S. (2001). Kinetic Aspects of the Maillard Reaction, a Critical Review. *Nahrung*, (3), 150-159.
- Van den berg, L., van Vliet, T., van der Linden, E., van Boekel, M., & van de Velde, F. (2007). Breakdown Properties and Sensory Perception of Whey Proteins/Polysaccharide Mixed Gels as a Function of Microstructure. *Food Hydrocolloids*, 21, 961-976.
- van Vliet, T. (1995). Mechanical Properties of Concentrated Food Gels. En: “*Food Macromolecules and Colloids*”. Eds: E. Dickinson & D. Lorient. Cambridge, The Royal Society of Chemistry.
- van Vliet, T. (1996). Large Deformation and Fracture Behaviour of Gels. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 1, 740-745.
- Vanaman, T., Brew, K., & Hill, R. (1970). The Disulfide Bonds of Bovine α -lactalbumin. *The Journal of Biological Chemistry*, 245-4583.
- Verheul, M., Pedersen, J. S., Roefs, S. P. F. M., & de Kruif, K. G. (1999). Association Behavior of Native β -lactoglobulin. *Biopolymers*, 49, 11-20.
- Verheul, M., Roefs, S. P., Mellema, J., & de Kruif, K. G. (1998). Power Law Behavior of Structural Properties of Protein Gels. *Langmuir*, 14, 2263-2268.

- Vigo, M. S., Malec, L. S., Gomez, R. G., & Llosa, R. A. (1992). Spectrophotometric Assay Using Ortho-Phthaldialdehyde for Determination of Reactive Lysine in Dairy-Products. *Food Chemistry*, 44, 363-365.
- Wagner, K., Derkits, S., Herr, M., Schuh, W., & Elmadfa, I. (2002). Antioxidative Potential of Melanoidins Isolated from a Roasted Glucose–Glycine Model. *Food Chemistry*, 78, 375-382.
- Walsh-O`Grady, D., O`Kennedy, B., Fitzgerald, R., & Lane, C. (2001). A Rheological Study of Acid-Set Simulated Yogurt Milk” Gels Prepared from Heat- or Pressure-Treated Milk Proteins. *Le lait*, 81, 637-650.
- Wang, Q., & Ismail, B. (2012). Effect of Maillard-Induced Glycosylation on the Nutritional Quality, Solubility, Thermal Stability and Molecular Configuration of Whey Protein. *International Dairy Journal*, 1-11.
- Wijewickreme, A. N., & Kitts, D. (1997). Influence of Reaction Conditions on the Oxidative Behavior of Model Maillard Reaction Products. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4571-4576.
- Wooster, T. J., & Augustin, M. A. (2007). Rheology of Whey Protein–Dextran Conjugate Films at the Air/Water Interface. *Food Hydrocolloids*, 21, 1072-1080.
- Xu, C., Yang, X., Yu, J., Qi, J., Guo, R., Sun, W., Yao, Y., & Zhao, M. (2010). The Effect of Glycosylation with Dextran Chains of Differing Lengths on the Thermal Aggregation of β -Conglycinin and Glycinin. *Food Research International*, 43 (9), 2270-2276.
- Yaylayan, V. A. & Huyghues-Despointes, A. (1994). Chemistry of Amadori Rearrangement Products, Analysis, Synthesis, Kinetics, Reactions, and Spectroscopic Properties. *Critical Reviews in Food and Nutrition*, 34, 321-369.

- Zacharius, R. M. , Zell, T. E. , Morrison, J. H., & Woodlock, J. J.. (1969). Glycoprotein Staining Following Electrophoresis on Acrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, 30 (1), 148-152.
- Zasykin, D. V., Dumay, E., & Cheftel, J. C. (1996). Pressure and Heat-Induced Gelation of Mixed β -lactoglobulin/Xanthan Solutions. *Food Hydrocolloids*, 10, 203-211.
- Zhu, D., Damodaran, S., & Lucey, J A. (2008). Formation of Whey Protein Isolate (WPI)-Dextran Conjugates in Aqueous Solutions. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7113-7118.

7. ANEXO

7.1. Nomenclatura

| | |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| a^* | Parámetro CIE Lab a^* |
| A_0 | Área inicial del gel |
| AGE | Productos de glicosilación tardíos (del inglés: “advanced glycation endproducts”) |
| A_M | Absorbancia de la muestra |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| a_w | Actividad de agua |
| A_{WPI} | Absorbancia del WPI |
| b^* | Parámetro CIE Lab b^* |
| CH | Clara de huevo |
| Conc | Concentración |
| Cys | Cisteína |
| Def. Rupt. % | Deformación a la ruptura |
| DSC | Calorimetría diferencial de barrido |
| DUV | Diferencia en el espectro ultravioleta |
| DX | Dextrano o dextranos |
| E | Módulo de Young |
| F(t) | Fuerza en función del tiempo |
| FITC | Fluoresceína isotiocianato |
| FITC-DX | Dextrano unido covalentemente a Fluoresceína isotiocianato |
| Fl PRM | Fluorescencia de los productos de reacción de Maillard |
| Fl Trp | Fluorescencia del triptofano |

| | |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| G´ | Módulo elástico |
| G´´ | Módulo viscoso |
| GAL | Grupos amino Libres |
| GEC | Goma espina Corona |
| H(t) | Altura en función del tiempo |
| H ₀ | Altura inicial del gel |
| H _F | Altura final del gel |
| K _b | Constante de Boltzmann |
| KI | Ioduro de Potasio |
| L* | Parámetro CIE Lab L* |
| Lys | Lisina |
| NH ₃ ⁺ | Grupo amino protonado |
| nm | nanómetros |
| pI | punto isoeléctrico |
| PM | Peso molecular |
| PRM | Productos de reacción de Maillard |
| Prot | Proteína |
| r_0^2 / r_f^2 | Front factor |
| RM | Reacción de Maillard |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| SDS-PAGE | electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio |
| -SH | Grupo sulfhidrilo |
| S-S | Puente disulfuro |

| | |
|-------------|---------------------------------------------------------------------|
| T | Temperatura |
| t gel | Tiempo de gelificación |
| T gel | Temperatura de gelificación |
| Te | Temperatura de endset |
| To | Temperatura de onset |
| Tp | Temperatura de pico |
| Trp | Triptofano |
| UV | Ultravioleta |
| UV-Vis | Ultravioleta-Visible |
| WF | Trabajo a la fractura |
| WPC | Concentrado de proteínas de suero |
| WPI | Aislado de proteínas de suero |
| WPI/DX | Sistema de WPI y dextrano, puede ser mixto o conjugado |
| WPI/DX15-25 | Sistema de WPI y dextrano de 15-25 kDa, puede ser mixto o conjugado |
| WPI/DX40 | Sistema de WPI y dextrano de 40 kDa, puede ser mixto o conjugado |
| WPI/DX6 | Sistema de WPI y dextrano de 6 kDa, puede ser mixto o conjugado |
| WPI/DX70 | Sistema de WPI y dextrano de 70 kDa, puede ser mixto o conjugado |

| | |
|--------------|--------------------------------|
| Δa^* | Cambio en parámetro CIE Lab a* |
| Δb^* | Cambio en parámetro CIE Lab b* |
| ΔE | Cambio de color |
| ΔH | Cambio de entalpía |
| ΔL^* | Cambio en parámetro CIE Lab L* |
| α -lc | alfa-lactoalbúmina |

| | |
|----------------|-------------------------------------------|
| β -lg | beta-lactoglobulina |
| ϵ_H | Esfuerzo de Hencky |
| ϵ_M | Esfuerzo máximo de Hencky (a la fractura) |
| λ | Longitud de onda |
| λ_{em} | Longitud de onda de excitación |
| λ_{ex} | Longitud de onda de emisión |
| σ_H | Esfuerzo de Hencky |
| σ_M | Esfuerzo máximo a la fractura |
| ξ | Tamaño de poro |

7.2. Listado de Figuras

Figura 1.1. (A) β -lactoglobulina y (B) α -lactoalbúmina de suero de leche

Figura 1.2. Dos tipos de geles formadas por la agregación de proteínas globulares (A) Agregación al azar. (B) agregación de collar de perlas (adaptado de Oakenful et al., 1997).

Figura 1.3. Esquema de los diferentes tipos de microestructura de geles de proteínas globulares: (A) de filamentos finos, (B) geles agregados o particulados (adaptado de Pilosof (2000)).

Figura 1.4. Relación entre la apariencia del gel y la modulación de la repulsión electrostática. Figura adaptada de Doi & Kitabatake (1997).

Figura 1.5. Redes de geles mixtos. (A) Redes interpenetrantes. (B) Red de fases separadas. (C) Redes acopladas. Figura adaptada de Oakenfull et al. (1997).

Figura 1.6. Esquema de los pasos de la reacción de Maillard.

Figura 1.7. Inicio de la reacción de Maillard partiendo de D-glucosa. (Adaptado de Oliver et al., 2006)

Figura 1.8. Inicio de la reacción de Maillard partiendo de D-fructosa. (Adaptado de Oliver et al., 2006).

Figura 1.9. Esquema de la reacción de Maillard entre una proteína y un polisacárido.

Figura 1.10. Los dextranos están compuestos por cadenas lineales de residuos de D-glucosa unidos por enlaces α (1-6), con algunas ramificaciones en posición α (1-3).

Figura 1.11. Gráfico hipotético del comportamiento de un gel biopolimérico durante la aplicación de un esfuerzo. Las barras rojas indican las condiciones límites de viscoelasticidad lineal y fractura. La parte I indica estructura intacta, la parte II pequeñas grietas y la parte III la fractura. Las esferas grises indican que esas moléculas se separaron del resto de la red.

Figura 1.12. Reómetro oscilatorio con platos paralelos.

Figura 1.13. Respuesta de diferentes materiales al esfuerzo oscilante sinusoidal.

Figura 1.14. Evolución de G'' , G' y Temperatura en función del tiempo de una solución de WPI al 12% p/p.

Figura 1.15. Espectro mecánico de un gel verdadero.

Figura 1.16. Máquina universal de ensayos Instron.

Figura 1.17. Las relaciones entre esfuerzo y deformación en un gel típico bajo compresión.

Figura 3.1. Escala de color (x, y, L) CIE Lab 1979.

Figura 4.1. Electroforesis de conjugados WPI DX (15-25 kDa). Calle 1: β -lg; calle 2: WPI no incubado; calle 3, 5 y 7: WPI incubado 2, 5 y 9 días, respectivamente; calle 4, 6 y 8: conjugado WPI/DX (7,2% de DX) incubado 2, 5 y 9 días, respectivamente. (A): Marcado

con Comassie Blue (tinción de proteínas), **(B)**: Marcado con Fucsina básica (tinción de glicoproteínas).

Figura 4.2. Cuantificación de grupos aminos libres (GAL) mediante la técnica del OPA, según los días de reacción de sistemas conjugados WPI/DX (15-25 kDa) incubados 2 (●), 5 (▲) y 9 días (▼) para todas las concentraciones estudiadas, con respecto a WPI no incubado (100% GAL).

Figura 4.3. Fotografía de geles mixtos WPI/DX (15-25 kDa) (A) y geles conjugados WPI/DX (15-25 kDa) incubados 2 (B), 5 (C) y 9 (D) días y a todas las concentraciones.

Figura 4.4. Diferencia de espectros UV con respecto al WPI no incubado de WPI no incubado (—), WPI incubado 2 (—), 5 (—) y 9 días (—) (A); sistemas WPI/DX incubados 2 (B), 5 (C) y 9 días (D), donde la concentración de DX es 0,15 (—); 0,30 (—) y 0,45 % p/p (—).

Figura 4.5. (A): Absorbancia de compuestos intermediarios tempranos de la reacción de Maillard, absorbancia a 284 (A) y 304 nm (B), y absorbancia de compuestos intermediarios tardíos de la reacción de Maillard (absorbancia a 420 nm) (C) de sistemas WPI no incubado (■); y sistemas WPI/DX incubado 2 (●), 5 (▲) y 9 días (▼).

Figura 4.6. Fluorescencia intrínseca de soluciones WPI (A) no incubado (■), WPI incubado 2 (●), 5 (▲) y 9 (▼) días y WPI/DX conjugados por Reacción de Maillard a 2 (B), 5 (C) y 9 (D) días de reacción (WPI con 0 (■); 0,15, (●), 0,30 (▲) y 0,45 % p/p (▼) de DX de 15-25 kDa.

Figura 4.7. Fluorescencia de productos de reacción de Maillard ($\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$) de sistemas WPI (■) y WPI con 0,15% p/p de DX, (●), WPI con 0,30 % p/p de DX (▲) y WPI con 0,45 % p/p de DX (▼) incubados 2 (A), 5 (B) y 9 (C) días.

Figura 4.8. DSC de WPI al 12% no incubado (—), WPI incubado 2 días (—), 5 días (—) y 9 días (—).

Figura 4.9. Evolución de G' (■), G'' (●) y $\tan \delta$ (+) durante la gelificación inducida por calor de: una solución de WPI al 12 % p/p (A) y soluciones de WPI al 12% previamente incubadas 2 días (B), 5 días (C) y 9 días (D). En todos los casos también se indica el perfil de temperatura (—).

Figura 4.10. Evolución de G' (■), G'' (●) y $\tan \delta$ (+) durante la gelificación inducida por calor de: solución WPI/DX (15-25 kDa) (DX al 7,2% p/p) mixta (A) y conjugadas 2 (B), 5 (D), y 9 días (E). En todos los casos también se indica el perfil de temperatura (—).

Figura 4.11. Evolución de G' durante la gelificación inducida por calor de soluciones de WPI al 12% a distintos días de incubación (A) y de soluciones WPI/DX con 7,2% p/p de DX a distintos días de incubación (B). En ambos casos: (■) 0, (★) 2, 5 (▲) y 9 días (▼); y (—) perfil de temperatura.

Figura 4.12. Espectro mecánico (barrido de frecuencia) de geles de WPI (12% p/p) no incubado (A) y previamente incubado 2 (B), 5 (C) y 9 (D) días.

Figura 4.13. Espectro mecánico (barrido de frecuencia) de geles WPI/DX mixto (A) e incubado 2 (B), 5 (C) y 9 (D) días. La concentración de WPI es del 12 % p/p y la DX del 7,2 % p/p.

Figura 4.14. Valor de n para sistemas WPI (■) y WPI/DX (15-25 kDa) (●) a distintos días de incubación. Los sistemas WPI y WPI/DX a 0 días, son WPI no incubado y WPI/DX mixto, respectivamente.

Figura 4.15. Esfuerzo (σ_H) vs Deformación de Hencky (ϵ_H) para geles de WPI y de WPI/DX al 12 % p/p de proteínas y con DX 15-25 kDa al: 0 % p/p DX (■), 3,6% p/p (●), 7,2 % p/p (▲). y 10,8% p/p (▼), mixtos (A) e incubados 2 (B), 5 (C) y 9 días (D).

Figura 4.16. Módulo de Young para (A) geles mixtos (★) y (B) geles conjugados WPI/DX (15-25 kDa) a 2 (●), 5 (▲) y 9 (▼) días de incubación y según la concentración de DX.

Figura 4.17. Tamaños de poros calculados mediante la teoría de elasticidad de las gomas. (A) geles WPI/DX (15-25 kDa) mixtos (★) y (B) conjugados a 2 (●), 5 (▲) y 9 (▼) días de incubación, según la concentración de DX.

Figura 4.18. Imágenes de Microscopía Láser Confocal de Barrido de geles de WPI no incubado (A), WPI incubado 2 (B), 5 (C) y 9 (D) días; y de WPI/DX no incubados (mixto) (E) e incubados 2 (F), 5 (G) y 9 (H) días

Figura 4.19. Electroforesis de conjugados WPI DX (6, 40 y 70 kDa). Calle 1: β -lg, calle 2: WPI no incubado, calle 3: WPI incubado 5 días, calle 4, 5 y 6: conjugado WPI/DX (WPI al

12% p/p y DX al 7.2% p/p) con DX de 6, 40 y 70 kDa, respectivamente, calle 7: WPI incubado 5 días, calle 8: DX de 40 kDa. (A): Marcado con Comassie Blue (tinción de proteínas), (B): Marcado con Fucsina básica (tinción de glicoproteínas).

Figura 4.20. Cuantificación de Grupos Aminos Libres (GAL) de sistemas WPI/DX conjugados a 5 días de reacción con DX de 6 (●), 40 (▲) y 70 (▼) kDa. Se tomó como referencia (100% de GAL) al WPI no incubado.

Figura 4.21. Parámetros de color CIE Lab: a^* (A), b^* (B), L^* (C) y ΔE (D) de polvos conjugados WPI/DX con DX 6 (●), 40 (▲) y 70 (▼) kDa.

Figura 4.22. Geles WPI/DX mixtos con DX de 6 kDa (A) y conjugados con DX de 6 (B), 40 (C) y 70 (D) kDa.

Figura 4.23. Diferencia de absorbancia (DUV) WPI/DX con DX de 6 kDa (A), 40 kDa (B) y 70 kDa (C). Las concentraciones de DX en los sistemas WPI/DX son: 0 (—), 0,15 (—); 0,30 (—) y 0,45 % p/p (—). En todos los sistemas la conc. de WPI fue de 0,5 % p/p.

Figura 4.24. Absorbancia a 284 (A), 304 (B) y 420 (C) nm de WPI no incubado (■) y sistemas WPI/DX incubados 5 días con DX de 6 (●), 40 (▲) y 70 kDa (▼).

Figura 4.25. Fluorescencia intrínseca de WPI no incubado (0,5 % p/p) (★), WPI incubado 5 días (0,5 % p/p) (■) y WPI/DX incubados 5 días con 0,15 (●), 0,30 (▲) y 0,45 % p/p (▼) de DX de 6 (A), 40 (B) y 70 (C) kDa.

Figura 4.26. Emisión de fluorescencia de los productos de reacción de Maillard (PRM) ($\lambda_{\text{ex}}=365$ nm) para sistemas WPI nativo (★) y WPI incubado (■) (A); y WPI/DX incubados 5 días con 0 (■), 0,15 (●), 0,30 (▲) y 0,45 % p/p (▼) de DX de 6 (B), 40 (B) y 70 (C) kDa.

Figura 4.27. Evolución de G' (□), G'' (○) y $\tan \delta$ (+) durante la gelificación inducida por calor de: una solución de WPI (A) y soluciones mixtas (no incubadas) WPI/DX con DX de 6, (B), 40 (C) y 70 (D) kDa.

Figura 4.28. Evolución de G' (□), G'' (○) y $\tan \delta$ (+) durante la gelificación inducida por calor de una solución de WPI (A) y soluciones WPI/DX con DX de 6, (B), 40 (C) y 70 (D) kDa incubadas 5 días.

Figura 4.29. Evolución del módulo elástico (G') en función del tiempo y la temperatura para sistemas WPI/DX mixtos (no incubados) (A) y (B) sistemas WPI/DX conjugados (incubados) donde (■) WPI; (★) WPI/DX 6; (▲) WPI/DX 40 y (▼) WPI/DX 70. En todos los sistemas: 12% p/p WPI 12 % y 7,2 % de DX.

Figura 4.30. Módulo elástico (G') a 90 y 25°C de sistemas WPI/DX mixtos (no incubados) (■) y sistemas WPI/DX conjugados (incubados) (▲) con DX de distintos pesos moleculares.

Figura 4.31. Barrido de frecuencia de geles WPI (A) y WPI/DX mixtos con DX de 6 (B), 40 (C) y 70 kDa (D). (En todos ellos 12% p/p WPI y 7,2% p/p DX).

Figura 4.32. Barrido de frecuencia de geles de WPI incubado 5 días (A) y geles de WPI/DX con DX de 6 (B), 40 (C) y 70 (D) kDa. (En todos ellos 12% p/p WPI y 7,2% p/p DX).

Figura 4.33. Valor de n para sistemas WPI/DX mixtos (■) y WPI/DX conjugados (●) con DX de distintos PM. (WPI a 0 días = WPI no incubado y WPI/DX a 0 días = WPI/DX mixto).

Figura 4.34. Esfuerzo vs Deformación de Hencky para geles WPI/DX mixtos con DX de 6(A), 40 (B) y 70 (C) kDa a todas las concentraciones ensayadas: 0,0 (■), 3,6 (●), 7,2 (▲) y 10,8 (▼) % p/p de DX. (En todos los sistemas: 12% p/p WPI)

Figura 4.35. Esfuerzo vs Deformación de Hencky para geles WPI/DX conjugados con DX de 6(A), 40 (B) y 70 (C) kDa a todas las concentraciones ensayadas: 0,0 (■), 3,6 (●), 7,2 (▲) y 10,8 (▼) % p/p. (En todos los sistemas: 12% p/p WPI).

Figura 4.36. Módulo de Young de geles WPI/DX mixtos (A) y conjugados (B) con DX de 6 (●), 40 (▲) y 70 (▼) kDa según la concentración de DX.

Figura 4.37. Imágenes obtenidas mediante Microscopía Laser Confocal de Barrido de geles de WPI (A), mixto WPI/DX (40 kDa) (B), conjugado WPI/DX (40 kDa) (C), todos ellos marcados de forma no covalente con Rodamina B; y gel mixto WPI/DX40 con WPI marcado de forma no covalente con Rodamina B (D) y DX marcado de forma covalente con FITC (E) y su imagen superpuesta (F).

7.3. Listado de Tablas

Tabla 1.1. Contenido proteico del suero lácteo.

Tabla 1.2. Algunas propiedades funcionales de proteínas de suero en la industria alimentaria.

Tabla 3.1. Actividad de agua de distintas sales a 60°C.

Tabla 3.2. Técnica de tinción de glicoproteínas según Zacharius et al. (1969).

Tabla 4.1. Parámetros Cielab de polvos WPI/DX (15-25 kDa) incubados 2, 5 y 9 días de reacción, a todas las concentraciones estudiadas.

Tabla 4.2. Parámetros obtenidos de las curvas de DSC.

Tabla 4.3. Parámetros obtenidos de los reogramas de sistemas de WPI al 12% p/p con y sin agregado de DX (7,2 % p/p) según los días de incubación: G' a 25 °C, $\tan \delta$ a 25 °C temperatura y tiempo de gelificación.

Tabla 4.4. Parámetros mecánicos de geles mixtos WPI/DX.

Tabla 4.5. Tiempo (t_{gel}) y Temperatura (T_{gel}) de gelificación de sistemas WPI 12% p/p/DX 7,2% p/p mixtos (0 días e incubación) y conjugados (5 días de incubación) mediante reacción de Maillard.

Tabla 4.6. Parámetros mecánicos de geles de WPI y mixtos WPI/DX (DX de 6, 40 y 70 kDa).

Tabla 4.7. Tamaño de poro de geles WPI/DX mixtos y conjugados según peso molecular de los DX.

7.4. Trabajos publicados en revistas Internacionales

Los resultados de la presente tesis fueron publicados en varios congresos nacionales e internacionales, y han sido publicado los siguientes trabajos en revistas internacionales:

1. Artículo publicado con sistemas WPI/Goma espina corona: Con estos sistemas se pusieron a punto las técnicas que se desarrollaron en la presente tesis.

- Spotti, M. J., Santiago, L. G., Rubiolo, A. C., & Carrara, C. R. (2012). Mechanical and Microstructural Properties of Milk Whey Protein/Espina Corona Gum Mixed Gels. *LWT - Food Science and Technology*, 48, 69-74.

2. Artículos publicados con los datos obtenidos de la Sección 4.1: Sistemas WPI/DX (15-25 kDa): Efecto de los días de reacción sobre los productos de reacción de Maillard.

- Spotti, M. J., Perduca, M. J., Piagentini, A., Santiago, L. G., Rubiolo, A. C., & Carrara, C. R. (2013b). Gel mechanical properties of milk whey protein/dextran conjugates obtained by Maillard reaction. *Food Hydrocolloids*, 31, 26-32.
- Spotti, M. J., Martínez, M. J., Pilosof, A. M. R., Candiotti, M. C., Rubiolo, A. C., & Carrara, C. R. (2014). Rheological properties of whey protein and dextran conjugates at different reaction times. *Food Hydrocolloids*, 38, 76-84.

3. Artículos publicados con los datos obtenidos de la Sección 4.2: Sistemas WPI/DX (6, 40 y 70 kDa): Efecto del peso molecular del dextrano.

-
- Spotti, M. J., Perduca M. J., Piagentini, A., Santiago, L. G, Rubiolo, A. C., & Carrara, C. R. (2013a). Does Dextran Molecular Weight Affect the Mechanical Properties of Whey Protein/Dextran Conjugate Gels? *Food Hydrocolloids*, 32, 204-210.
 - Spotti, M. J., Martinez, M. J., Pilosof, A. M. R. , Candiotti, M., Rubiolo, A. C., & Carrara, C. R. (2014). Influence of Maillard conjugation on structural characteristics and rheological properties of whey protein/dextran systems. *Food Hydrocolloids*, 39, 223-230.