

Trabajos

Estudio de la desnaturalización térmica y agregación de las proteínas de suero por calorimetría diferencial de barrido

RECIBIDO: 15/05/2009

ACEPTADO: 17/09/2009

Antuña, S.¹ • Celeghin, A.G.¹ • Rubiolo, A.C.²

¹Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL).
Pje. el Pozo. 3000 Santa Fe.

² Instituto de Desarrollo Tecnológico para
la Industria Química (UNL-CONICET)
Güemes 3450. 3000 Santa Fe. E-mail: celeghin@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: En el presente trabajo se estudió la influencia de los tratamientos térmicos y de la congelación en suspensiones de proteínas de suero, preparadas a partir de un WPC comercial, mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido, para determinar la desnaturalización térmica de la beta-lactoglobulina y su estabilidad térmica. Las suspensiones de proteína de suero se trataron térmicamente a 70.0, 72.5 y 77.5°C, durante 6, 10 y 30 minutos. Un grupo de estas suspensiones se congeló 48 hs. a -25°C. El aumento en la intensidad del tratamiento térmico disminuyó la cantidad de proteína nativa y el aumento de proteína desnaturalizada favoreció la formación de agregados durante la congelación, lo que produjo valores más altos de la variación de la entalpía en las muestras tratadas térmicamente y congeladas.

PALABRAS CLAVE: proteínas de suero, desnaturalización, congelación.

SUMMARY: *Effect of Thermal Denaturation and Aggregation of whey proteins by Differential Scanning Calorimetry.*

The aim of this work was to study the effect of freezing on denatured protein content of heat-treated whey protein suspensions prepared from a commercial WPC. Differential scanning calorimetry was used to study thermal denaturation of beta-lactoglobulin and its thermal stability. Whey protein suspensions were heated at 70.0, 72.5, and 77.5 °C during 6, 10 and 30 minutes. A group of heat-treated suspensions was frozen in the freezer (-25 °C) for 48 hs. The increase in the heat treatment decreased the amount of native protein and the increase in denatured protein favored the formation of aggregates concentration during freezing. The enthalpy changes values of heat-treated and frozen samples were highest.

KEYWORDS: whey protein, denaturation, freezing

1. Introducción

El suero de la leche resultante de la elaboración de queso era frecuentemente desechado, o se lo utilizaba como alimento para el ganado o abono de tierras. Sin embargo, reconocido actualmente como una fuente importante de proteínas se lo procesa para usar como ingrediente en productos alimenticios para mejorar su valor nutricional y/o para obtener propiedades funcionales deseadas (1).

Las principales proteínas de suero son la beta-lactoglobulina y la alfa-lactoalbúmina, las que constituyen aproximadamente el 50% y 12%, respectivamente del total proteico, y la albúmina sérica bovina en menor proporción. Dado que la beta-lactoglobulina está en una concentración del 50% se la considera como representativa del contenido proteico y se estudia su comportamiento. Estas proteínas tienen estructuras globulares compactas, con una distribución bastante uniforme de la secuencia de residuos no polares, polares y cargados. De aquí que se pliegan intramolecularmente, introduciendo la mayoría de sus residuos hidrofóbicos, por lo tanto no tiene lugar una extensa auto-asociación o interacción con otras proteínas. La estructura de la beta-lactoglobulina depende del pH y al pH de la leche (6.6-6.7), forma un dímero con una geometría parecida a dos esferas tangencialmente unidas (2). El aumento de la temperatura ocasiona la disociación del dímero en monómeros. A una temperatura mayor de 60°C el monómero es parcialmente desplegado, exponiendo los grupos no polares y los grupos sulfidrilos. Así la formación de agregados depende de la concentración proteica y del pH. Hoffman y van Mil (3) encontraron que en el rango de pH 6.4-8.0 los agregados se forman principalmente por enlaces disulfuros intermoleculares y a pH 6.0 los agregados de mayor

tamaño se deben a enlaces no covalente, pero también se encontraron reacciones de intercambio sulfidriilo/disulfuro. Por lo tanto, al pH de la leche los agregados se formarían por enlaces disulfuro.

Las proteínas de suero se comercializan como aislados (WPI) o concentrados (WPC). Estos productos difieren tanto en la materia prima de origen como en la naturaleza del proceso de elaboración y consecuentemente en su composición. Durante la elaboración de los WPC se realizan operaciones de pasteurización, concentración y secado a temperaturas elevadas, que producen cambios en la composición, en las propiedades funcionales y características sensoriales. Como resultado de esas operaciones es la presencia de proteínas de suero desnaturadas-agregadas en la mayoría de las suspensiones de WPC (4)(5).

Las proteínas desnaturadas son capaces de interaccionar de manera más efectiva con los demás ingredientes que conforman los alimentos, debido a que poseen más cantidad de sitios activos expuestos que presentan una mayor reactividad. El calentamiento es el más común de los agentes físicos desnaturantes de las proteínas. La desnaturación por calor de una proteína globular soluble puede provocar la pérdida de la solubilidad. De esta forma para mejorar las propiedades funcionales de la beta-lactoglobulina y proteínas del suero, se recurrió al desplegamiento por tratamiento térmico (50-80°C, 1 ó 15 minutos) en un rango de pH 2-4 o ligeramente alcalino 7-8.5, en estas condiciones se produce un desplegamiento sin agregación, que incrementa la anfipolaridad de estas proteínas, inicialmente muy hidrofílicas (2). Este fenómeno permite que las proteínas interaccionen entre sí para formar agregados que a pH 6 no involucran enlaces covalentes (6).

También el congelamiento produce cambios en las interacciones de las proteínas. La congelación es un tratamiento ampliamente utilizado en la conservación de alimentos. Sin embargo, algunas proteínas forman agregados y precipitan cuando son sometidas a temperaturas de refrigeración o congelación y generan cambios indeseables, afectando la calidad de los productos (7)(2).

El comportamiento de las suspensiones de proteína de suero frente a un determinado tratamiento térmico y el efecto que puede producir la congelación sobre las suspensiones previamente tratadas térmicamente, dependerán de las condiciones del tratamiento aplicado así como también de la naturaleza y composición del WPC utilizado.

Desde el punto de vista tecnológico, muchas veces es necesario conocer la cantidad total de proteína desnaturalizada luego de un tratamiento térmico y el efecto de la congelación sobre las suspensiones, porque la desnaturalización de las proteínas del suero ocurre rápidamente a temperaturas superiores a 70°C. Para ello fue estudiada la estabilidad térmica de las proteínas de suero mediante calorimetría diferencial de barrido (8)(9). Las temperaturas de transición son aquellas en las que tiene lugar el desplegamiento de las proteínas y el calor absorbido durante este proceso es la entalpía de desnaturalización.

La calorimetría diferencial de barrido (CDB) se ubica dentro de las técnicas asociadas a los cambios de energía y constituye una herramienta para identificar y caracterizar materiales y mide la energía necesaria para hacer nula la diferencia de temperaturas entre una muestra y un material de referencia durante un período de tiempo o rango de temperatura, cuando ambos son colocados en un ambiente que se calienta o enfría a velocidad de ensayo previamente elegida.

En los termogramas, que son las representaciones gráficas de la técnica, la ordenada representa el flujo de calor debido a la diferencia de potencias entre las aplicadas a las celdas de la muestra y de la referencia, y la abscisa el tiempo o temperatura. Las transiciones que se registran en los termogramas se deben a cambios físicos que presentan los materiales estudiados. Entonces, el calorímetro diferencial de barrido utiliza el método de medición del flujo de calor basado en la compensación de potencia. En el presente trabajo se estudió la influencia de los tratamientos térmicos y de la congelación en suspensiones de proteínas de suero, preparadas a partir de un WPC comercial mediante la calorimetría diferencial de barrido.

2. Metodología

2.1. Preparación de las Suspensiones de Proteínas del Suero

Se utilizó un WPC comercial provisto por una empresa de la zona, obtenido a partir de suero dulce de queso por ultrafiltración, concentración y secado mediante procedimientos tecnológicos adecuados (Milkaut S.A., Franck, Santa Fe, Argentina). El contenido total de proteína se estimó a partir del contenido de nitrógeno total determinado por el método de Kjeldahl usando un digestor automático Büchi 430 (Büchi, Flawil, Suiza), una unidad de destilación Büchi 322 y un titulador automático Mettler DL40RC (Mettler Instrumente AG, Greifensee, Suiza). El contenido de nitrógeno se multiplicó por un factor de 6,38 para expresar los resultados como contenido de proteína láctea. El producto presentó un 36.0% de composición proteica inicial.

Se prepararon suspensiones de proteína de suero, con una concentración de proteína total de 5 y 9% p/v, pesando una cantidad apropiada de WPC en tubos de vidrio

previamente tarados y disolviéndola en agua destilada con agitación vigorosa. El pH inicial de las suspensiones fue de $6,5 \pm 0,1$.

2.2. Tratamientos Térmicos y Congelación

Los tubos de vidrio conteniendo las suspensiones de proteína de suero se trataron térmicamente a $70,0^\circ\text{C}$ durante 30 minutos, a $72,5^\circ\text{C}$ durante 10 y 30 minutos y a $77,5^\circ\text{C}$ durante 6 minutos utilizando un baño termostatzado con recirculación Haake DC 30 (Haake Instruments Inc., Alemania). Luego los tubos se enfriaron en agua con hielo durante 3 minutos. Las suspensiones tratadas térmicamente (ST) se almacenaron en heladera a 5°C durante 48 hs. Un grupo de suspensiones tratadas térmicamente se congeló (ST-C) a -25°C en freezer durante 48 hs. y se descongeló en baño termostatzado a 20°C . Además, suspensiones sin tratamiento térmico (SC) fueron utilizadas como control para las ST y sin tratamiento térmico y congeladas (SC-C) para las ST-C.

2.3. Ensayos Calorimétricos

Las mediciones calorimétricas se realizaron con un calorímetro diferencial de barrido (CDB) (Mettler Toledo 821e, Greifensee, Suiza). La calibración de la temperatura y entalpía se efectuaron teniendo como referencia la temperatura de comienzo de fusión del indio ($156,6^\circ\text{C} \pm 0,3^\circ\text{C}$) y el calor de fusión del indio ($28,45 \pm 0,6 \text{ J/g}$). Las muestras fueron procesadas entre 40 a 100°C a una velocidad de $5^\circ\text{C}/\text{min}$. Se colocaron 20 microlitros de muestra en cápsulas de aluminio, herméticamente cerradas. Una cápsula de aluminio con 20 microlitos de agua destilada fue usada como referencia. Las medidas se realizaron por duplicado. Una vez colocadas las muestras en el equipo, fueron purgadas con flujo de nitrógeno seco (20

ml/min) para evitar la condensación de humedad del aire.

El análisis térmico de una muestra proteica realizado por CDB consistió en estudiar el proceso de desplegamiento o desnaturalización térmica a partir de un termograma donde se graficó el flujo de calor en función de la temperatura. Las transiciones endotérmicas observadas en los termogramas de las muestras corresponden a la(s) temperatura(s) de apertura (despliegue) de la estructura globular acompañadas de ruptura de enlaces covalentes; el pico de la endoterma, llamada temperatura de desnaturalización (T_d) de las proteínas, es una medida de la estabilidad térmica de las mismas. La variación de entalpía debido al desplegamiento de la proteína, es un parámetro termodinámico, que se asocia con procesos reversibles, donde se utilizan velocidades de calentamiento muy lentas y concentraciones muy bajas de proteínas, para evitar la agregación térmica. El cambio entálpico que se registra es el resultado de la combinación de las reacciones endotérmicas producidas por la ruptura de los enlaces intermoleculares de la proteína nativa y los nuevos enlaces que se formaron en los agregados.

2.4. Tratamiento de datos

El cambio de entalpía total se calculó midiendo el área bajo el pico de la endoterma de desnaturalización usando una línea de base entre las temperaturas de comienzo y final de la transición térmica, empleando el OriginPro 4.1 Microcal Software, Inc. One Roundhouse Plaza. Northampton, MA 01060 USA.

3. Resultados

Las transiciones térmicas observadas en los termogramas de la Figura 1, corresponden a proteína nativa presente en las mues-

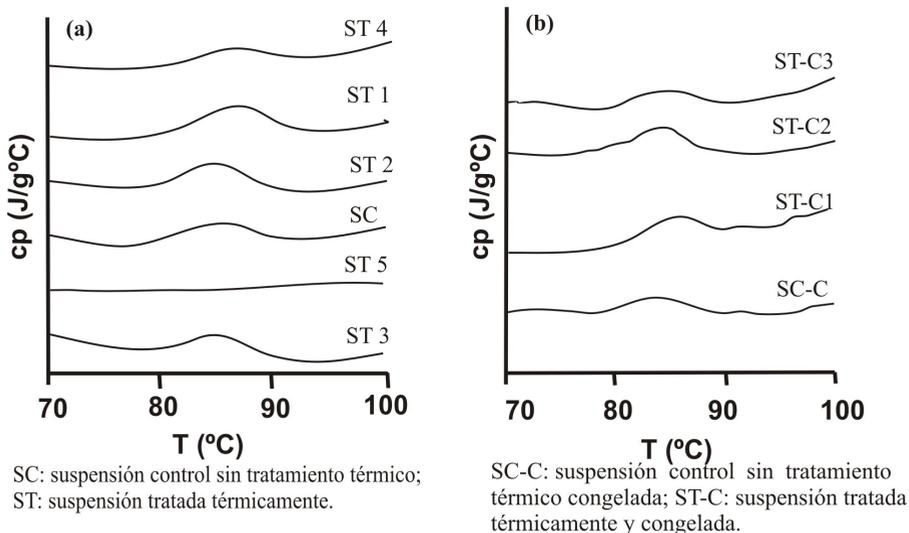
tras, luego de los diferentes tratamientos. Las endotermas de desnaturalización pertenecen a la beta-lactoglobulina, observándose una transición térmica en el rango de 80-90°C. Qi y col. (10) demostraron que las temperaturas de disociación del dímero de la beta-lactoglobulina son más altas a mayores concentraciones de proteína y se obtienen valores más altos de flujo de calor endotérmico a bajas concentraciones de la proteína como se obtuvo en la muestra ST4.

La ausencia de transición térmica indica que la proteína fue desdoblada totalmente previo a la corrida como ocurrió con la muestra ST5. La muestra ST1 registró un pico endotérmico a $85.5 \pm 0.8^\circ\text{C}$ y la ST3 a $84.3 \pm 0.4^\circ\text{C}$ correspondiente a su temperatura de desnaturalización. El corrimiento en el valor de la temperatura de desnaturalización de la ST3

se atribuiría a una pérdida de la estabilidad térmica de la proteína al aumentar el tratamiento térmico y va acompañado con una disminución en la variación de la entalpía por ser menor la cantidad de proteína nativa. Los tratamientos térmicos realizados a las suspensiones de proteínas de suero, a dos concentraciones de proteínas totales y los parámetros térmicos obtenidos del análisis de los termogramas de las muestras a las que se les realizó el ensayo calorimétrico, se muestran en la Tabla 1.

Se observa que el aumento en la temperatura de desnaturalización, en el tiempo de desnaturalización y en la concentración de proteínas, produjo una disminución en la variación de entalpía porque hay menos cantidad de proteína nativa en la muestra. Cerca del punto isoeléctrico de la proteína (pH 5.3), la diso-

Figura 1: Termogramas de las muestras tratadas térmicamente (a) y de las muestras tratadas térmicamente y congeladas (b).



Código	Muestra	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)	ΔT (°C)	ΔH (J/g)
SC				79 – 83	17.02
ST	1	30	70	86 – 90	20.45
	2	10	72.5	78 – 84	19.13
	3	30	72.5	83 – 87	14.95
	4*	30	72.5	85 – 90	20.73
	5	6	77.5	80 – 86	19.35
SC-C				80 – 87	30.80
ST-C	1	30	70	83 – 90	31.12
	2	10	72.5	81 – 87	26.51
	3	6	77.5	81 – 86	26.83

Tabla 1: Tratamientos y parámetros térmicos de las suspensiones WPC estudiadas a la velocidad de ensayo de 5°C/min.

* Concentración de la muestra 5%

ciación seguida del desplegamiento de la proteína ocurre lentamente, y los grupos sulfidrilo permanecen ocultos en los dímeros o monómeros de la beta-lactoglobulina desplegada. Además a pH 6, los agregados físicos formados generalmente alcanzan gran tamaño y no incluirían, o en pequeña magnitud, efectos exotérmicos. Así la diferencia observada entre los valores de variación de entalpía de las muestras tratadas térmicamente y las muestras tratadas térmicamente y luego congeladas, se atribuye a la agregación de moléculas desnaturalizadas, producida por el congelamiento. La formación de nuevos enlaces intermoleculares de naturaleza no covalente, en los agregados involucra la absorción de calor para romperlos produciendo un aumento en los valores de la variación de la entalpía de las muestras que fueron congeladas luego del tratamiento térmico. La formación de numerosos agregados proteicos formados por la mayor cantidad de proteína desnaturalizada al incrementar la temperatura del tratamiento térmico, aumentó también la velocidad de agregación global de las proteínas lo que fue coincidente con los hallazgos de Meza y col. (11).

4. Conclusiones

Teniendo en cuenta que se empleó en el estudio un WPC comercial, se observó que:

1. El aumento en la intensidad del tratamiento térmico disminuyó la cantidad de proteína nativa, representado por la disminución en la variación de la entalpía,
2. El congelamiento no acentuó la desnaturalización de las proteínas del suero a las temperaturas y tiempos empleados,
3. El aumento en los valores de la variación de entalpía de las muestras congeladas y previamente tratadas térmicamente, se atribuiría a una ruptura de enlaces (hidrofóbicos, fuerzas de Van der Waals) en los agregados proteicos formados por congelamiento. Estas alteraciones facilitan la desnaturalización de mayor cantidad de proteína,
4. La mayor cantidad de proteína nativa en la muestra con mayor contenido de proteínas totales permitió una mejor definición en los termogramas a la velocidad de corrida.

Bibliografía

1. Fitzsimons, S.M., Mulvihill, D.M., Morris, E.R., 2007. Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, 21: 638-644.

2. Fennema, O.R., 1993. "Química de los Alimentos". Editorial Acirbia S.A. (España), (cap) 5: 275-414, (cap.) 13: 889-930.
3. Hoffmann, M.A.M. and van Mil, P.J.J.M., 1999. Heat-induced aggregation of beta-lactoglobulinas a function of pH. *J.Agric.Food Chem.*, 47: 1898-1905.
4. Huffman Lee M., 1996. Processing whey protein for use as a food ingredient. *Food Technol.* 50(2): 49-54.
5. Puyol P., Cotter P.F. and Mulvihill D.M.. 1999. Thermal gelation of commercial whey protein concentrate: influence of pH 4.6 insoluble protein on thermal gelation. *J. Dairy Technol.*, 52(3):81-91.
6. Scilingo, A., 2000. Propiedades estructurales y funcionales de aislados proteicos de soja modificados. Efecto de la presencia de calcio. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de la Plata, Argentina.
7. Bakshi, A.S. and Johnson, R.M., 1983. Calorimetric studies on whey freeze concentration. *J. Food Sci.*, 48: 1279-1283.
8. Paulsson, M., Hegg, P. and Castberg, H.B., 1985. Thermal stability of whey proteins studied by differential scanning calorimetry. *Thermochim. Acta*, 95: 435-440.
9. Kilara, A. and Mangino, M.E., 1991. Relationship of solubility of whey protein concentrates to thermal properties determined by differential scanning calorimetry. *J. Food Sci.*, 56(5): 1448-1449.
10. Qi X.L., Brownlow S., Holt C. and Sellers P. 1995. Thermal denaturation of β -lactoglobulin: effect of protein concentration at pH 6.75 and 8.05. *Biochim. Biophys. Acta*, 1248: 43-49.
11. Meza, B. E., Verdini, R. A. y Rubiolo, A. C., 2006. Efecto de los tratamientos térmicos y de la congelación en la agregación de suspensiones de concentrado de proteína de suero. XXII Congreso Interamericano de Ingeniería Química. V Congreso Argentino de Ingeniería Química. 1 al 4 de Octubre de 2006, Buenos Aires, Argentina. Presentación en CD.