



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ESTUDIO DEL EFECTO DEL CALENTAMIENTO  
ÓHMICO EN PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO POR MEDIO  
DE MEDICIONES DE ROTACIÓN ÓPTICA”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO EN ALIMENTOS**

PRESENTA

**GERARDO ANTONIO ZAVALA GOMÉZ**

DIRIGIDA POR

**Dr. PEDRO ALBERTO VÁZQUEZ LANDAVERDE**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2008.

**BIBLIOTECA CENTRAL, U.A.Q.**

No. Adq. H72902

No. Título \_\_\_\_\_

Clas TS 641.371

Z38e

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ESTUDIO DEL EFECTO DEL CALENTAMIENTO  
ÓHMICO EN PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO POR  
MEDIO DE MEDICIONES DE ROTACIÓN ÓPTICA”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**GERARDO ZAVALA GOMÉZ**

**DIRIGIDA POR**

**Dr. PEDRO ALBERTO VÁZQUEZ LANDAVERDE**

**SINODALES**

**Dr. PEDRO VÁZQUEZ LANDAVERDE**  
DIRECTOR

---

**Dr. BLANCA GARCÍA ALMENDÁREZ**  
ASESORA INTERNA

---

**Dr. JORGE HUERTA RUELAS**  
SINODAL

---

**Q. en A. RAFAEL PÉREZ MUÑOZ**  
SINODAL

---

**Q.B. MAGALI E. AGUILAR ORTÍZ**  
DIRECTORA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Sistemas de caracterización de proteínas	3
II.1.1 DSC	3
II.1.2 Electroforesis	4
II.1.3 Métodos Ópticos	8
II.2 Métodos Térmicos de procesado de alimentos	10
II.2.1 Calentamiento Convectivo	10
II.3 Proteínas del Suero	12
II.3.1 $\beta$ -lactoglobulina	13
II.3.2 $\alpha$ - lactoalbumina	15
II.3.3 Otras Proteínas de Suero	17
II.4 Desnaturalización de proteínas	17
II.5 Efecto de los azúcares en la desnaturalización	18
III. HIPÓTESIS	20
IV. OBJETIVOS	21
IV.1 General	21
IV.2 Específicos	21
V. METODOLOGÍA	22
V.1 Mediciones Ópticas.	22



V.1.1	Preparación de Soluciones.	22
V.1.2	Materiales	23
V.1.3	Métodos	27
V.2	Electroforesis	29
V.2.1	Preparación de Soluciones	29
V.2.2	Materiales	30
V.2.3	Métodos	30
V.3	Granulometría	31
V.3.1	Materiales	31
V.3.2	Métodos	33
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	34
VI.1	Rotación Óptica	34
VI.1.1	Efecto del calentamiento convectivo	38
VI.1.2	Efecto del Calentamiento Óhmico	43
VI.2	Electroforesis	58
VI.3	Granulometría	62
VII.	CONCLUSIONES	64
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	65

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Características geles de Poliacrilamida	5
2 Proteínas de suero lácteo.	13
3 Temperaturas de inicio del cambio de conformación y de pérdida de señal, para soluciones de APS-90 en buffer de fosfatos 50 mM, tratadas por medio de calentamiento convectivo.	49
4 Temperaturas de inicio del cambio de conformación de ambas proteínas y de pérdida de señal, para una comparación entre el calentamiento convectivo y el óhmico.	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Desnaturalización proteica por mercaptoetanol	7
2 $\beta$ -lactoglobulina	14
3 $\alpha$ -lactoalbumina	16
4 Diseño del Equipo.	25
5 Cámara de Calentamiento Convectivo.	25
6 Aro de Aluminio.	26
7 Tapa de la Cámara.	26
8 Celda Calentamiento Convectivo.	26
9 Celda calentamiento óhmico.	28
10 Diagrama Lab View.	28
11 Granulometro CILAS 1064.	32
12 Termogramas de soluciones de $\beta$ -LGy $\alpha$ -LA.	36
13 Termogramas de soluciones de APS-90 en buffer de fosfatos 50mM pH=6.1, tratadas con calentamiento convectivo.	39
14 Termogramas de soluciones de APS-90 en buffer de fosfatos 50mM pH=3.1, tratadas con calentamiento convectivo	42
15 Termogramas de soluciones de APS-90 sin buffer con un pH inicial = 6.1 tratadas con calentamiento óhmico	46
16 Termogramas de soluciones de APS-90 sin buffer a un pH inicial de 6.1 tratadas con calentamiento convectivo	48
17 Comparación del primer cambio ocurrido en las soluciones tratadas por un calentamiento convectivo.	52
18 Comparación del segundo cambio ocurrido en las soluciones tratadas conectivamente.	54
19 Comparación de la pérdida de señal ocurrida en las soluciones tratadas convectivamente.	56
20 Comparación del primer cambio ocurrido en las soluciones donde	

se compararon ambos tratamientos.	57
21 Comparación del segundo cambio ocurrido en las soluciones donde se compararon ambos tratamientos.	59
22 Comparación de la pérdida de señal ocurrido en las soluciones donde se compararon ambos tratamientos.	60
23 Electroforesis SDS-PAGE	61
24 Grafica normalizada de tamaño de partícula	63



## RESUMEN

Las técnicas para tomar datos en tiempo real, han cobrado mucha importancia en los últimos años, ya que dan datos precisos y no se destruye la muestra, una de estas técnicas es la medición de la rotación óptica de sustancias ópticamente activas.

El calentamiento es un proceso ampliamente utilizado en la industria de los alimentos, se han buscado nuevas alternativas de calentamiento en donde este sea más eficiente

En este trabajo se estudió el cambio conformacional de las proteínas de suero lácteo sufrido por dos tipos diferentes de calentamiento por medio de su rotación óptica.

Se prepararon Soluciones de Aislado Proteico de Suero (APS) a dos concentraciones diferentes con dos valores de pH y tres azúcares diferentes, Se trato a estas soluciones con calentamiento convectivo y óhmico. Para las mediciones ópticas se utilizó un sistema que usa un láser modulado a través de un modulador fotoelástico, y un detector. Y la adquisición de datos se realizó por medio de una tarjeta de adquisición y software especializado, posteriormente se aplicaron análisis estadísticos para evaluar la magnitud de los cambios observados.

Muestras iguales de APS fueron sometidas a los dos calentamientos y posteriormente se les realizaron Estudios de electroforesis SDS-PAGE y de Granulometría.

## I. INTRODUCCION

Las técnicas ópticas para realizar mediciones en alimentos, cada vez son más conocidas y ganan terreno. Ya que dan información sobre el sistema en tiempo real y no es necesario destruir la muestra.

Una de las técnicas más antiguas para medir azúcar por ejemplo es la rotación óptica, esta propiedad, puede ser medida gracias a una propiedad que tienen algunos compuestos orgánicos, llamada quiralidad, esta propiedad la presentan los compuestos carbónicos en los cuales hay 4 sustituyentes diferentes alrededor de un átomo de carbono. Y gracias a esto presenta una rotación dependiendo al arreglo de los sustituyentes que este tiene.

El calentamiento es uno de los primeros procesos que fueron aplicados en alimentos y sus fundamentos ya están ampliamente estudiados, el calentamiento más utilizado es el calentamiento convectivo que consiste en calentar una superficie, y por transferencia de calor esperar a que esta superficie caliente el alimento. Sin embargo, se ha observado que este tipo de calentamiento no es muy eficiente, y requiere de un consumo de energía muy elevado. Se han investigado nuevos tipos de calentamiento para disminuir los gastos en energía y calentar alimentos más rápidamente usando el mínimo de energía. Una opción que se ha estudiado en los últimos años es el calentamiento óhmico que consiste en pasar una corriente eléctrica a través del alimento, usando dos placas metálicas paralelas que están en contacto con el alimento y funcionan como cátodo y ánodo.

El calentamiento óhmico aun no está totalmente estudiado y no se sabe con certeza que efectos podría tener en el alimento, pero día a día se realizan más estudios que nos ayudan a comprender mejor lo que ocurre a nivel molecular en el alimento al ser sometido a este tipo de calentamiento.



Algunas de las ventajas que presenta el calentamiento óhmico es que, es mas eficiente ya que a diferencia de el calentamiento convectivo, que calienta la superficie para que esta caliente al alimento, calienta al alimento del centro a la superficie, gracias a esto el calor no se pierde hacia el ambiente y se requiere menos energía para calentar porciones iguales del alimento.

El suero lácteo es un ingrediente que ha cobrado mucha importancia en la industria alimentaría en la ultima década, ya que su calidad proteica excede a la del patrón de la FAO (1.14) esto es ya que contiene una mayor cantidad de aminoácidos esenciales, además de su gran valor nutritivo se le han encontrado muchas propiedades que son usadas en tecnología de alimentos, es un muy buen estabilizante, emulsionante, un buen agente gelante y una muy buena aceptación organoléptica.

Desafortunadamente en México no existe la infraestructura para poder obtener concentrados de proteína de buena calidad a partir del suero lácteo, y las empresas que utilizan el suero como ingrediente tienen que importarlo de países desarrollados como Estados Unidos, Nueva Zelanda o la Unión Europea.

Para poder aislar las proteínas del suero se requiere un proceso de ultrafiltración en el cual se requiere usar temperaturas que pueden afectar la calidad de las proteínas, es por eso que se están ideando sistemas en los cuales se puede monitorear el proceso para observar los cambios que sufren estas proteínas para evaluar su calidad a lo largo de su procesamiento, una de estas técnicas es la evaluación de la rotación óptica.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Sistemas de caracterización de proteínas

A lo largo del tiempo se han usado diversos sistemas para poder estudiar y observar el comportamiento de las proteínas, sistemas que permiten distinguir la concentración, la pureza, la desnaturalización, y hasta distinguir entre sus diferentes tipos.

Los sistemas más utilizados son la calorimetría de barrido diferencial del inglés: Differential Scanning Calorimetry (DSC), la Electroforesis, y últimamente se están desarrollando nuevos sistemas más rápidos, eficientes y que puedan medir parámetros en línea y en tiempo real.

#### II.1.1 DSC

DSC es una técnica termoanalítica en la que se usa el cambio de estado de agregación de la muestra para poder detectar cambios en el nivel de energía. Estos cambios pueden manifestarse por la liberación o absorción de calor (Skoog y col., 1998).

Las proteínas pueden sufrir transiciones de fase como fusión, cristalización y cambios conformacionales. Los estudios de DSC aprovechan estas características para obtener datos termodinámicos de las proteínas como el cambio en la entalpía ( $\Delta H$ ), temperatura de desnaturalización ( $T_d$ ), temperatura de fusión ( $T_m$ ), y temperatura de cristalización ( $T_g$ ) (Relkin, 1994).

En un análisis DSC se observa la diferencia de calor entre una muestra y una referencia y esta diferencia es medida como una función de la temperatura. Se usa un diseño de tal modo que la temperatura del portador de muestra aumenta linealmente en función del tiempo (Bollag y col., 1992).



La muestra de referencia debería tener una capacidad calorífica bien definida en el intervalo de temperaturas en que vaya a tener lugar el barrido. El principio básico de esta técnica es que cuando la muestra experimenta una transformación física tal como una transición de fase, se necesitará que fluya diferente cantidad de calor a la muestra que a la referencia para mantener ambas a la misma temperatura. El que fluya más o menos calor a la muestra depende de si el proceso es exotérmico o endotérmico (Dean, 1995).

### II.1.2 Electroforesis

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida, denominada PAGE, por su nombre en inglés: polyacrilamide gel electrophoresis es una de las técnicas más usadas para caracterizar mezclas complejas de proteínas. La electroforesis en poliacrilamida es un método, rápido y económico a nivel de muestra pues se requieren sólo cantidades del orden de microgramos de proteína lo que permite realizar estudios muy precisos con cantidades muy pequeñas de muestra (Bollag y col., 1992).

Las proteínas presentan una carga eléctrica neta si se encuentran en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoeléctrico y por eso tienen la propiedad de desplazarse cuando se someten a un campo eléctrico. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. Cuanto mayor carga por unidad de masa más rápida será la migración (Lodish y col., 2004).

Una ventaja importante de los geles de poliacrilamida es que son químicamente inertes, transparentes y estables en un amplio rango de pHs, temperatura y fuerza iónica. Algunas características destacables de estos geles se muestran en el siguiente cuadro (Cuadro 1).



Cuadro 1. Características geles de Poliacrilamida.

Características geles de Poliacrilamida	
Formación	Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador ('cross-linking'), la bis-acrilamida en presencia de un iniciador y un catalizador. Como iniciador se suele utilizar TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y como catalizador el ión persulfato ( $S_2O_8^-$ ) que se añade en forma de persulfato amónico.
Cuidados	Las soluciones de acrilamida se desgasifican pues el oxígeno es un inhibidor de la polimerización. Además, durante la polimerización se libera calor que podría provocar la formación de burbujas en el seno del gel.
Velocidad de polimerización	Se determinada por la concentración de persulfato (catalizador) y TEMED (iniciador).
Porosidad del Gel	La determina las proporciones relativas de poliacrilamida y bis-acrilamida, siendo menor el poro cuanto más bisacrilamida vs. acrilamida se use.
Porcentaje total de acrilamida (%T)	Determina el rango de separación del gel. Habitualmente los geles se denominan en función del % de acrilamida/bisacrilamida que contienen (%T). Así, la mayoría de las proteínas se separan bien en el rango 5 a 10% T. Un menor porcentaje (mayor tamaño de poro) es mejor para separar proteínas de gran tamaño.

En función del estado de las proteínas (nativo o desnaturalizado) a lo largo del proceso electroforético éstas se clasifican en electroforesis nativas o desnaturalizantes.

La electroforesis desnaturalizante más común, es la que somete a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturalización (pérdida de la estructura tridimensional). En esta situación la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula pero no a su forma. El agente desnaturalizante más empleado es el sodiododecilsulfato o SDS, un detergente.

La electroforesis nativa es la que somete a las proteínas a migración sin desnaturalización. En esta situación las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma. Además se mantienen en ciertos casos las interacciones entre subunidades y entre proteínas, separándose los complejos. Los sistemas tampón (buffer) empleados en estos caso son : tris-glicina (rango de pH 8.3 a 9.5), tris-borato (rango de pH 7.0 a 8.5) y tris-acetato (rango de pH 7.2 a 8.5) (Chambach y Rodbard, 1971).

## SDS-PAGE

SDS-PAGE es la electroforesis de proteínas más ampliamente usada. Su nombre significa la electroforesis en geles de poliacrilamida que se realiza en presencia de SDS ('SDS-polyacrilamide gel electrophoresis'). Fue descrito por Laemmli. Se trata de un tipo de electroforesis desnaturalizante en la que las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturalizantes (beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturaliza y recubre a la proteína con cargas netas negativas), y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas (Figura 1).

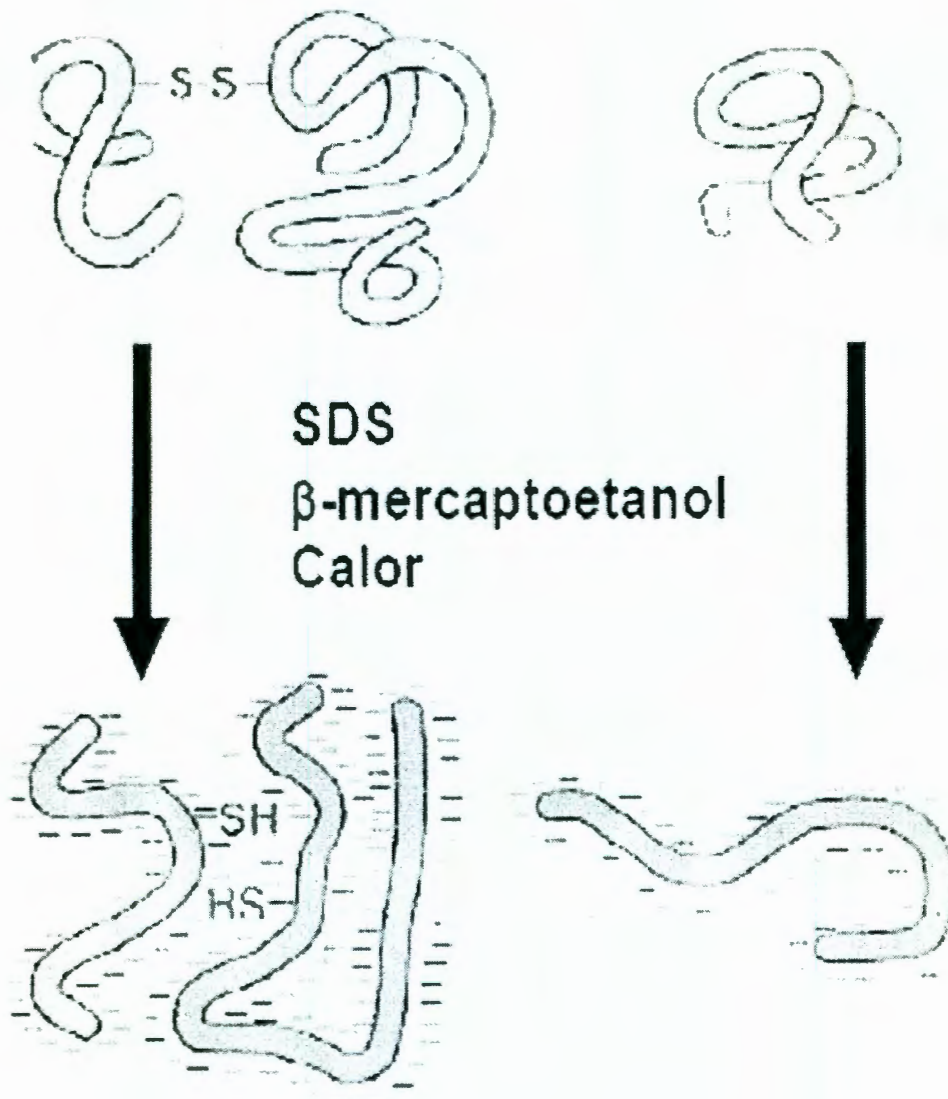


Figura 1. Desnaturalización proteica por mercaptoetanol.



SDS es un detergente de acción desnaturizante que se une a las cadenas polipeptídicas desnaturizadas con una relación de 1.4 g de SDS por g de proteína, uniéndose aproximadamente una molécula de SDS por cada dos aminoácidos de la cadena. Esta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS viajen hacia el ánodo. La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional sólo a la masa de la proteína pues todas tienen la misma carga por unidad de masa. Se puede entonces determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos. Las movilidades de las proteínas en los geles de SDS-PAGE son funciones lineales del logaritmo de su peso molecular (Bollag y col., 1992).

### II.1.3 Métodos Ópticos

Los métodos ópticos para caracterizar proteína no han sido muy utilizados ya que no eran conocidos o no se habían desarrollado lo suficiente para usarse a nivel industrial. En los últimos años han demostrado ser muy eficientes, ya que pueden proporcionar resultados en tiempo real, sin necesidad de destruir la muestra, lo que proporciona un gran ahorro en tiempo energía y cantidad de muestra usada.

Estos métodos se basan en algunos principios básicos como la rotación óptica, los moduladores fotoelásticos, transmisión de luz, y otros que a continuación veremos más a fondo.

#### Rotación Óptica

Para la medición del parámetro rotación óptica se han desarrollado diferentes sistemas o instrumentos llamados polarímetros. El instrumento mas simple es el polarímetro manual el cual consiste de un arreglo óptico conformado por un

polarizador, un analizador y un sistema telescópico. La muestra se coloca en un tubo que esta entre el polarizador y el analizador. El principio de medición de la rotación óptica consiste en pasar luz polarizada a través de la muestra y, usando el analizador, determinar a que ángulo el plano de polarización del analizador es perpendicular al plano de polarización de la luz que pasa por la muestra. En este punto la luz se extingue completamente, por lo que el ángulo formado entre el plano de polarización del polarizador y la perpendicular al plano de polarización del analizador da, en grados, la rotación específica de la muestra (Brown, 1945).

Existen instrumentos que miden la rotación óptica utilizando diferentes componentes que modulan el estado de polarización de la luz. La utilización de estos moduladores ópticos, dentro de los sistemas que miden la rotación óptica, permiten hacer determinaciones más exactas en el cambio del plano de polarización, ocasionado por la muestra. Uno de los primeros moduladores ópticos es el modulador basado en el efecto Faraday cuya característica principal consiste en que cuando una onda linealmente polarizada se propaga a través de un medio dieléctrico paralelo a un campo magnético, producido por una bobina alrededor de un cristal, el plano de polarización gira. Una manera diferente de cambiar el estado de polarización de la luz es utilizando celdas hechas con materiales que muestren el efecto Kerr y Pockels, en las cuales las sustancias anisótropas sometidas a un campo eléctrico se vuelven birrefringentes (propiedad de desdoblar un rayo de luz incidente en dos rayos linealmente polarizados de manera perpendicular entre sí como si el material tuviera dos índices de refracción distintos.) (Collett, 1993).

### Modulador Fotoelástico

El sistema construido en este trabajo utiliza un modulador fotoelástico (PEM), el cual es diferente a los mencionados anteriormente. El principio de funcionamiento del PEM, se basa en la aplicación de una presión y estiramiento mecánicos de un cristal por medio de piezoeléctricos, produciendo así un cambio en el material haciéndolo birrefringente.



El PEM tiene la propiedad de que puede modular el estado de polarización de la luz a frecuencia alta (del orden de kHz, dependiendo de la frecuencia de resonancia del cristal birrefringente, ver Apéndice B). Si una onda linealmente polarizada pasa a través del cristal del PEM, esta luz cambiará su estado de polarización a esa frecuencia pasando por estados sucesivos de polarización. Estos cambios pueden ir de lineal a circularmente polarizada pasando por estados de polarización elíptica, dependiendo del retardo aplicado a la componente paralela del campo eléctrico del haz incidente respecto al eje del modulador (Hinds Instruments).

Este equipo ha sido utilizado para realizar múltiples experimentos, sobre rotación óptica de compuestos en alimentos como los realizados por (Mendoza y col., 2005) que observaron el comportamiento de la desnaturalización térmica de la BSA al adicionar diferentes azúcares. (Kongraksawech y col., 2007) por otro lado estudiaron el efecto de la fuerza iónica y el pH en la desnaturalización térmica de la BSA utilizando este mismo equipo. Otros estudios realizados en este equipo fueron los elaborados por (Vázquez y col., 2007) en los cuales evaluaron los sistemas ópticos acoplados al calentamiento óhmico, y observaron que ya sea por calentamiento convectivo u óhmico se pueden realizar mediciones ópticas fidedignas para evaluar el cambio conformacional y la desnaturalización proteica.

## II.2 Métodos Térmicos de procesamiento de alimentos

El Tratamiento térmico de alimentos es uno de los procesos más efectivos para la conservación y transformación de alimentos y materias primas. Fue uno de los primeros procesos que fueron usados a lo largo de la historia del hombre, y sigue y seguirá siendo utilizado para atender la creciente demanda de alimentos a nivel mundial (Welti y col., 2005).

### II.2.1 Calentamiento Convectivo

Más que un tipo de calentamiento es una forma de transmisión de calor. En

transferencia convectiva de calor la energía se transmite por una combinación de conducción de la energía almacenada y por efecto de la mezcla y el movimiento del alimento líquido, dicha mezcla es provocada por la diferencia de densidades que es provocada por el gradiente térmico entre el líquido que está en contacto con las paredes y el que se encuentra en la zona interior del recipiente (Rao y Anantheswaran, 1988).

En el calentamiento convectivo la velocidad de penetración de calor en el alimento contenido dentro del recipiente puede incrementarse debido a la agitación, en el tratamiento el movimiento del producto dentro del recipiente mejora la transferencia de calor y puede reducir significativamente el tiempo de tratamiento (Welti y col., 2005).

#### Calentamiento óhmico

El calentamiento óhmico se produce cuando una corriente eléctrica pasa a través de un alimento, provocando la elevación de la temperatura en su interior como resultado de la resistencia que ofrece al paso de la corriente eléctrica. Las ventajas de este proceso se derivan del hecho de que el calentamiento tiene lugar en el interior del alimento. De este modo, y a diferencia de lo que ocurre en un calentamiento convencional, no existen superficies calientes de contacto (Ayadi y col., 2004).

Aplicar un campo eléctrico permite descender las temperaturas de secado, que es muy importante para materiales sensibles a la temperatura, ya que secar a temperaturas elevadas puede causar efectos indeseables para el material, como pérdida de color, desnaturalización de proteínas, destrucción de vitaminas, y pérdida de compuestos aromáticos y de sabor. Estudios previos han demostrado que el campo eléctrico puede mejorar ampliamente el proceso de secado de alimentos (Lebovka y col., 2006).



### II.3 Proteínas del Suero

Las proteínas del suero son las proteínas mejor caracterizadas de la leche. Últimamente han cobrado una gran importancia en la industria alimentaria, no solo por su gran valor nutritivo sino por un sinnúmero de propiedades que pueden ser explotadas tecnológicamente, como retención de agua, agentes gelantes, emulsificantes, y una sensación de cremosidad en la boca (Holt, 1999).

Las características antes mencionadas hacen que el uso de concentrados de proteína de suero lácteo en la industria de alimentos hayan aumentado drásticamente, en los últimos 15 años (Boye y col., 2004).

El suero lácteo de leche de vaca contiene dos proteínas principales  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) 50% y la  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -LA) 20% y el 30 % restante lo comprenden Proteosomas-peptonas 12-20% e inmunoglobulinas (IG) 10%. (Figura 2). La  $\beta$ -LG y la  $\alpha$ -LA contienen un alto porcentaje de estructuras secundarias terciarias y cuaternarias, generalmente son proteínas globulares y son desnaturalizadas a altas temperaturas, comienza a 65°C y finaliza casi por completo a 90°C durante 5 min. No son fosforiladas y son insensibles al  $\text{Ca}^{2+}$ . Todas las proteínas de suero tienen enlaces disulfuro intramoleculares para estabilizar su estructura (Fox, 2000).

Los concentrados de proteína de suero comercial varían considerablemente en sus propiedades funcionales dependiendo de su origen y el método usado para aislarlas, esta variabilidad puede ser atribuida a diferencias en la cantidad de  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG, lactosa, grasa, minerales y en los cambios ocurridos en la proteína debidos al proceso. La variación de los concentrados de suero lácteo es uno de los retos más grandes que tienen los investigadores para entender las bases moleculares de su funcionalidad. Otro reto al que se enfrentan es que los concentrados de suero se usan en una gran variedad de productos, cada uno de composición estructura y procesamiento únicos (Kulmyrzaev y col., 2000).

Las principales proteínas del suero varían ampliamente en su peso molecular, y en su punto isoeléctrico, en el siguiente cuadro (Cuadro 2) se muestran los pesos moleculares, la composición promedio respecto a la proteína total del suero y el punto isoeléctrico de cada proteína.

Cuadro 2. Proteínas de suero lácteo.

Proteína	Composición respecto a la proteína total del suero (%)	Peso molecular (kDa)	Punto isoeléctrico pI
$\beta$ -lactoglobulina	44-53	36	5.3
$\alpha$ -lactoalbúmina	15-18	14.4	4.2-4.5
Inmunoglobulinas	9-11	>300	5.6
Seroalbúminas	4.8-5	69	4.7
Proteosas y peptonas	15-22	4.1-20	3.3-3.7

El procesamiento térmico es un factor muy importante en una amplia de productos basados en proteínas de suero, estos procesamientos térmicos pueden tener muchos efectos en las proteínas, ya que estas cambian de estructura gradualmente durante su calentamiento, hasta llegar a su desnaturalización completa (Gordon y Kalan, 1974).

### II.3.1 $\beta$ -lactoglobulina

La  $\beta$ -lactoglobulina (Figura 2) es la proteína principal del suero lácteo, la  $\beta$ -LG al pH de la leche existe como un dímero, con una masa de ~36 kDa, sin embargo esta se disocia a monómeros con una masa molecular de 18.3 kDa a pH inferior a 3.0, Estos monómeros están compuestos de 162 aminoácidos.



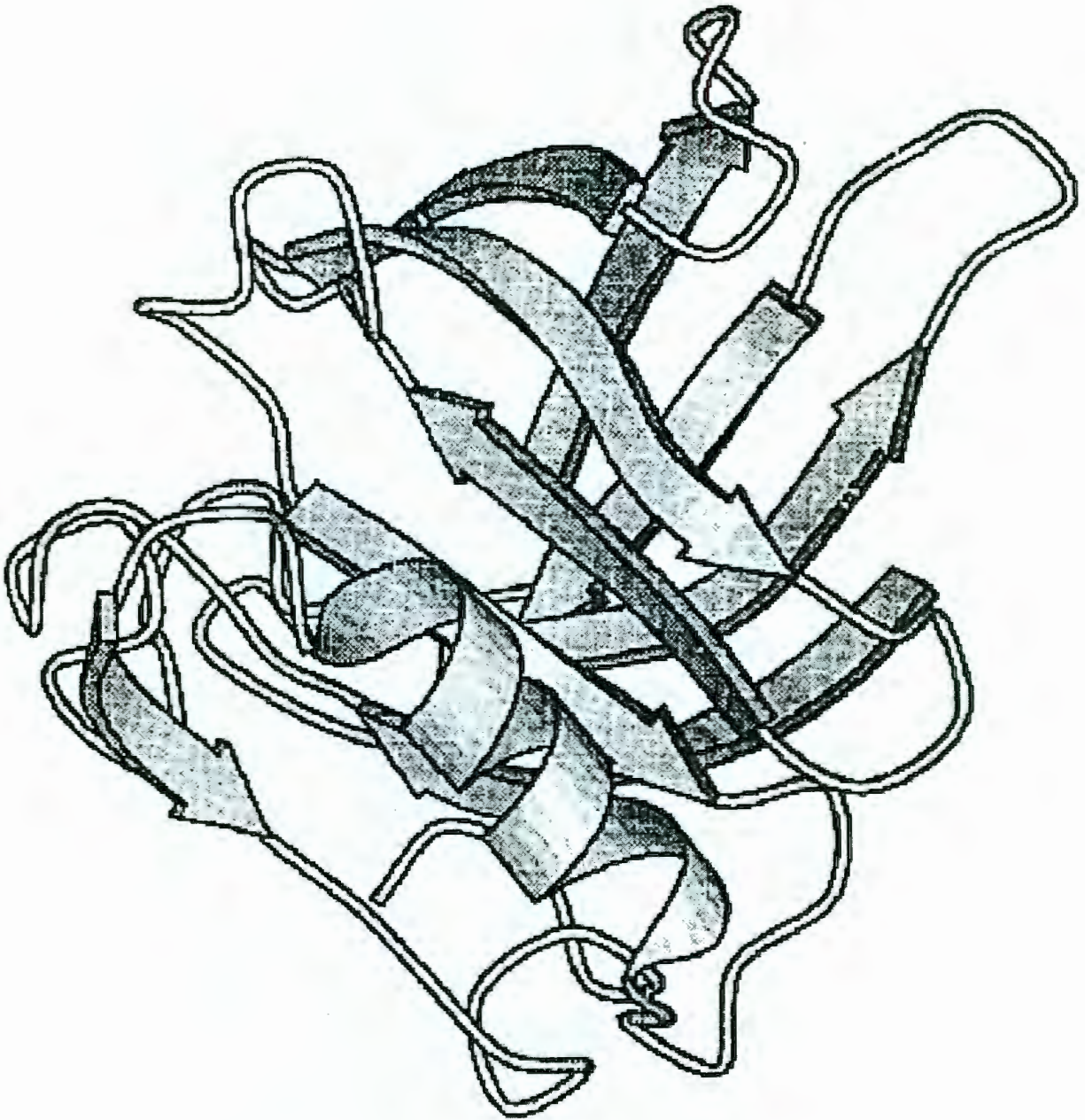


Figura 2.  $\beta$ -lactoglobulina (Yada, 2004).



Tiene dos enlaces disulfuro ( Cys66-Cys 160 y Cys-106-Cys119) y una cisterna libre (C121). Al desnaturalizar esta proteína por calentamiento ocurren reacciones de intercambio Tio/Disulfuro llevando a la formación de enlaces disulfuro intermoleculares, estos enlaces pueden ser expuestos y activados cuando la proteína es desnaturalizada, y tener interacciones sulfidril-disulfuro con otras proteínas formando un complejo (Zhang y col., 2004).

La  $\beta$  -LG se encuentra principalmente en su estructura cuaternaria que consiste en las formas oligoméricas en equilibrio con la forma monomérica, que pueden ser disociados por efecto del pH causando un aumento en la reactividad del sulfhidrilo libre (Kella y Kinsella, 1988).

Existen muchos estudios del comportamiento térmico de la  $\beta$ -LG basados en métodos analíticos como calorimetría diferencial de barrido (DSC), Espectroscopia circular dicroista (CD), Electroforesis, Fluorescencia, y resonancia magnética nuclear. Existen muchos métodos para lograr que las proteínas sean mas estables al calentarlas. Uno frecuentemente utilizado es la adición de azúcares, polioles, sales y polímeros, que de alguna forma interaccionan con la proteína, o la cubren protegiéndola de cambios durante el procesamiento (Zhang y col., 2004).

### II.3.2 $\alpha$ - lactoalbumina

La  $\alpha$ -lactoalbumina (Figura 3) es la segunda proteína mas abundante en el suero lácteo después de la La  $\beta$ -lactoglobulina, su concentración en la leche cruda es  $\sim 1.2$ mg/mL, es una molécula globular de  $\sim 14.2$  kDa, tiene además cuatro enlaces disulfuro intermoleculares que le proporcionan resistencia a la desnaturalización e hidrofobicidad que le confiere propiedades como emulsificado y espumado.

Una de las características mas importantes de la  $\alpha$ - LA es su capacidad para atraer cationes metálicos. La proteína tiene un sitio de gran afinidad por los iones  $Ca^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ . Cuando la proteína es separada de la leche contiene un mol de  $Ca^{2+}$

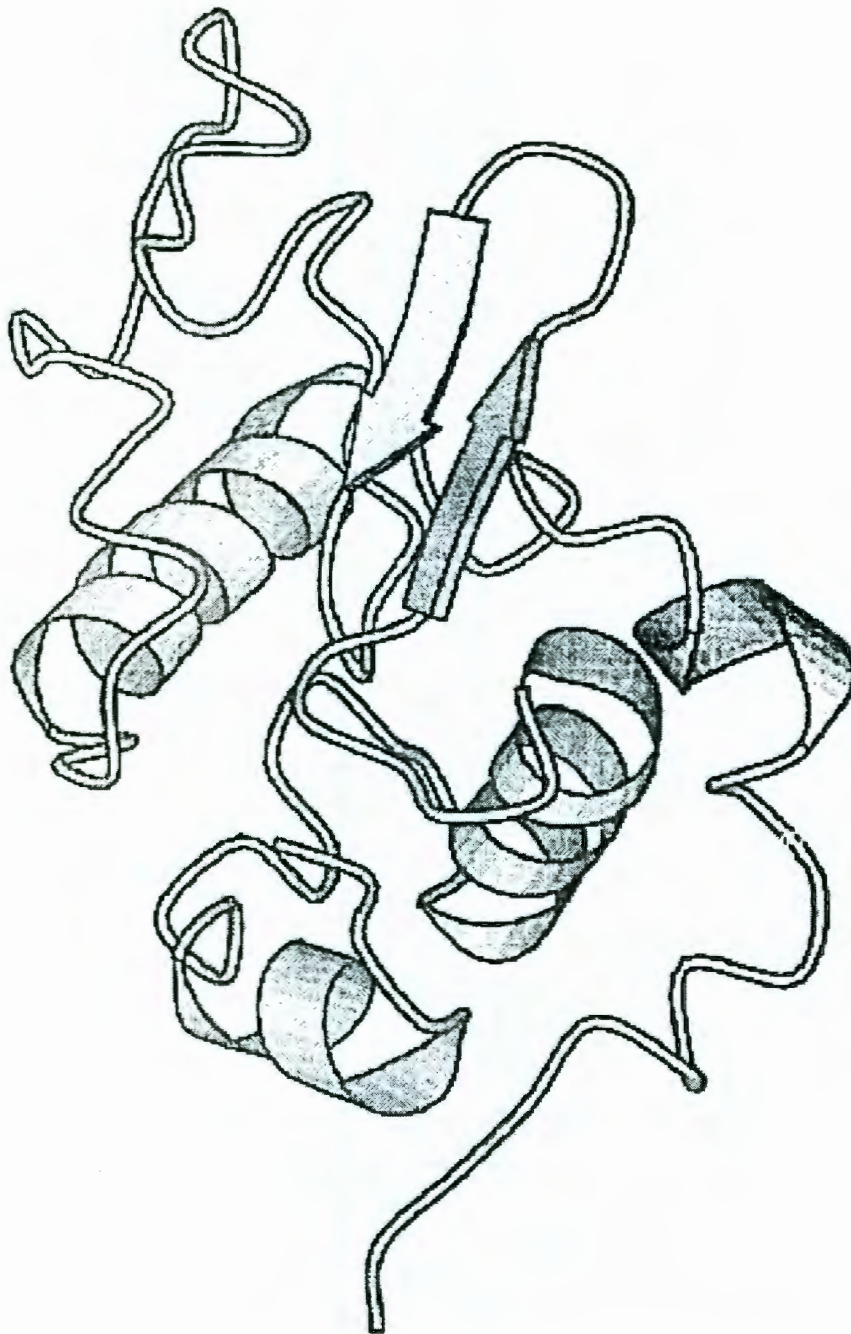


Figura 3.  $\alpha$ -lactoalbumina (Yada, 2004).

por cada mol de proteína, esta también se enlaza a metales como  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Na^+$  y  $K^+$  pero en mucho menor grado, la remoción del calcio de la  $\alpha$ -LA causa un importante cambio en la conformación de esta, además de que queda mas propensa a la desnaturalización (Wehbi y col., 2005).

La  $\alpha$ -LA, por si sola es incapaz de formar geles . Sin embargo, al estar en solución junto con la  $\beta$ -LG Favorece la formación de geles ya que la  $\beta$ -LG contienen grupos sulfhidrilos libres que interaccionan con la  $\alpha$ -LA y les confiere resistencia (Matsudomi y col., 1993).

### II.3.3 Otras Proteínas de Suero

Existen otras proteínas minoritarias en el suero lácteo que en realidad no aportan mucho a sus propiedades fisicoquímicas:

- Proteasas Peptonas- son una mezcla de fosfoglucoproteínas que comprenden del 10-20% de las proteínas totales del suero (Fennema, 1965).
- Lactoferrina –Proteína de un peso molecular de ~86 kDa.
- Inmunoglobulinas

### II.4 Desnaturalización de proteínas

El calentamiento es un proceso importante en la manufactura de muchos productos, como el yogurt, leche en polvo leche UHT, y es usado para modificar las propiedades funcionales, y para asegurar la inocuidad de los alimentos. Muchas reacciones químicas ocurren al calentar, pero una de peculiar importancia es la desnaturalización de las proteínas de suero, estas reacciones pueden ser afectadas por el pH, sales ( fuerza iónica ) y la concentración de la proteína (Oldfield y col., 2005).



La desnaturalización térmica de una proteína provoca un aumento en el área de contacto de la proteína con el solvente, así como un aumento en la hidrofobicidad de la superficie (Kulmyrzaev y col., 2000).

## II.5 Efecto de los azúcares en la desnaturalización

Un gran número de productos alimenticios y farmacéuticos que contienen concentrados de proteínas de suero también contienen azúcar, muchos estudios han comprobado que los azúcares tienen ciertos efectos en la desnaturalización de proteínas. Se ha encontrado que muchos azúcares como la glucosa la fructosa y la galactosa inhiben la aparición de grupos sulfidrilo cuando las proteínas son calentadas esto incrementa la temperatura de desnaturalización de la  $\beta$ -LG y muchos tipos de proteínas globulares. Se cree que el mecanismo por el cual esto sucede es que el azúcar disminuye la afinidad termodinámica de la proteína por el solvente.

La sacarosa aumenta la atracción entre las moléculas de proteína una vez que estas son desdobladas, lo que debe de aumentar el grado de agregación de las proteínas. La susceptibilidad de las proteínas de suero de agregarse en la presencia de azúcares depende en el balance que existe entre su capacidad para estabilizar las proteínas contra el desdoblamiento y su habilidad para promover los enlaces entre proteína y proteína (Kulmyrzaev y col., 2000).

La interacción de monosacáridos y disacáridos en las propiedades químicas de la proteína es evidente. La sacarosa estabiliza la tubulina y otras proteínas a través de hidratación preferencial no específica. La sacarosa inhibe los enlaces sulfidril-disulfuro de la  $\alpha$ -LA y la  $\beta$ -LG durante el tratamiento térmico (Garrett y col., 1988).

Es bien sabido que el pH la fuerza iónica, los minerales y la temperatura tienen un gran impacto en las proteínas de suero para que puedan funcionar como emulsificantes y agentes formadores de geles, así mismo en la formulación de cada alimento puede haber muchos compuestos que interfieren o alteran las

propiedades funcionales de las proteínas tales como polisacáridos, azúcares, vitaminas, lípidos, surfactantes, colorantes y saborizantes (Kulmyrzaev y col., 2000).



### **III.HIPÓTESIS**

Los cambios conformacionales en proteínas de importancia en alimentos pueden ser estudiados al monitorear su señal de rotación óptica. Estos cambios podrían ser diferentes si la naturaleza del calentamiento cambia.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1 General

Estudiar el efecto del calentamiento óhmico en proteínas de suero lácteo por medio de mediciones de rotación óptica.

### IV.2 Específicos

Caracterizar los cambios en la señal de rotación óptica sufridos por las proteínas de suero lácteo en solución, sometidas a calentamiento.

Estudiar el efecto del calentamiento convectivo (Control) en la señal de rotación óptica de soluciones de proteínas de suero lácteo bajo diferentes condiciones de pH, concentración y presencia de azúcares.

Estudiar el efecto del calentamiento óhmico en la señal de rotación óptica de soluciones de proteínas de suero lácteo bajo diferentes condiciones de pH, concentración y presencia de azúcares.

Estudiar por medio de electroforesis, las muestras sometidas a calentamiento óhmico y calentamiento convectivo.

Llevar a cabo estudios de granulometría de dispersión de luz, las muestras sometidas a calentamiento óhmico y calentamiento convectivo.

## V. METODOLOGÍA

### V.1 Mediciones Ópticas.

#### V.1.1 Preparación de Soluciones.

Se prepararon soluciones de aislado proteínico de suero (APS) (Pure WPI, Bioplex Nutrición Inc, Bellingham, Washinton, E.U.) al 1.5 y 2 % (w/v) disueltos en una solución amortiguadora de fosfatos a pH 3.1 y 6.4 preparados de la siguiente forma:

- Sol. amortiguadora pH 3.1, 10mM, 14 mM fuerza iónica ( 1L)
  - Se pesaron 1.143156 g. De Fosfato monobásico de potasio (marca Karal, León, Guanajuato) y se disolvieron en 500 ml. De agua destilada.
  - Se le agregaron 0.06822 ml de ácido fosforico (Karal).
  - Se le agregaron 0.2939 g de NaCl para ajustar fuerza iónica.
  - Se aforo a 1litro.
  - Se midió el pH para corroborar.
  
- Sol. amortiguadora pH 6.4, 10mM, 14mM fuerza iónica ( 1L )
  - Se pesaron 1.0887 g. De Fosfato monobásico de potasio y se disolvieron en 500 ml. De agua destilada.
  - Se pesaron 0.3309g. de Fosfato dibasico de potasio (Karal) y se disolvieron en los 500 ml de agua en los que se disolvió el fosfato monobásico (Karal).
  - Se le agrego 0.001 g. De NaCl para ajustar fuerza iónica.
  - Se aforo a 1litro.
  - Se mido el pH para corroborar.

Una vez preparados las soluciones amortiguadoras se prepararon 25 ml de cada solución de APS de la siguiente forma:



- Se pesaron :
  - $0.5 \text{ g} \pm 0.0005\text{g}$  de APS (Bioplex Nutrition) para la concentración de 2%
  - $0.375\text{g} \pm 0.0005\text{g}$  de APS para la concentración de 1.5%

Otro factor que se evaluó en el experimento fue la interacción con azúcares, para esto se utilizaron Dextrosa (Kara León, Guanajuato), Fructosa (Abaquim Mexico, D.F.), y Sorbitol (Sigma Chemicals, St. Louis Montana, E.U.).

Para las muestras que contienen algún azúcar:

- Se pesaron  $0.125 \pm 0.0005\text{g}$  del azúcar y se agregó al APS previamente pesado.
- Se agregaron 20 ml del amortiguador correspondiente al la proteína y el azúcar.
- Se agitó durante 2.5 min. con un agitador magnético.
- Se filtro la solución, en una membrana millipore de  $0.45\mu\text{m}$ .

### V.1.2 Materiales

Se realizaron las mediciones ópticas en un equipo (Figura 4) compuesto de un modulo láser polarizado semiconductor a 643 nm (Modelo LTG65012A5-T, Lasermate Group, Inc., Pomona, California, E.U. ), Que proporciona el as de luz que pasara por un polarizador Glan Taylor (Modelo MGTYB20, Karl Lambrecht Corp., Chicago, Illinois, E.U. ) cuyo grado de polarización fue colocado a un ángulo de  $45^\circ$  con respecto a la horizontal, la luz fue modulada a 50 HHZ usando un modulador fotoelástico. (Modelo PEM-80, Hinds International, Inc., Hillsboro, Oregon, E.U.) El rayo láser modulado paso por una celda, donde se colocó la solución de APS y por un polarizador Rochon (Modelo RPPC-0912, Lambda Research Optics, Inc., Costa Mesa, California, E.U.) que actuó como analizador. Un detector silicón (Modelo UV-005, OSI, Optoelectronics Inc., Hawthorne, California, E.U.) con un JFET Op-amp de bajo ruido (OSI Optoelectronics, Inc. ) fue utilizado para detectar cambios en la rotación óptica y luz transmitida en el

rayo láser. La señal eléctrica fue filtrada usando un amplificador lock-in (Modelo 5207, EG&G Princeton Applied, Research, Princeton, New Jersey, E.U.) operado con una constante de tiempo de 3 seg. la sensibilidad del amplificador lock-in fue ajustada para cada concentración de APS para maximizar la señal y minimizar el ruido.

Las señales ópticas y de temperatura fueron colectadas por una tarjeta de adquisición de datos (DAQ 036E, Nacional Instrument Inc., Austin, Texas, E.U.) controlada usando Lab View (Version 7 Express, National Instrument Inc ).

Se compararon dos métodos de calentamiento el calentamiento convectivo y el calentamiento óhmico.

#### Calentamiento Convectivo

Se controló la temperatura de la muestra usando una cámara de calentamiento (Figura 5) construida para el experimento, esta cámara esta compuesta por un cilindro de aluminio de 24 cm. de diámetro cerrada por un lado con una ventana circular de 3 cm. de diámetro por donde pasa el láser, y abierto por el otro lado donde se inserta un aro de aluminio (Figura 6) del mismo diámetro el cual tiene una rosca en el centro donde se acopla la celda, el cilindro tiene un orificio lateral en el que hay una manguera metálica con una resistencia eléctrica y un ventilador de una secadora de pelo comercial. Para evitar que el calor salga de la cámara se construyó una tapa metálica (Figura 7) que se acopla directamente a la cámara.

La celda (Figura 8) fue fabricada específicamente para el experimento, esta es un cilindro de acero inoxidable con dos roscas en los extremos, en la cual se introduce un empaque, un vidrio de forma circular, y una tapa de acero inoxidable que se acopla con la rosca de la celda. La celda tiene un orificio en la parte central donde se introduce un dispositivo Im-32 (marca Nacional Semiconductor, Santa Clara, California E.U.) para monitorear la temperatura.



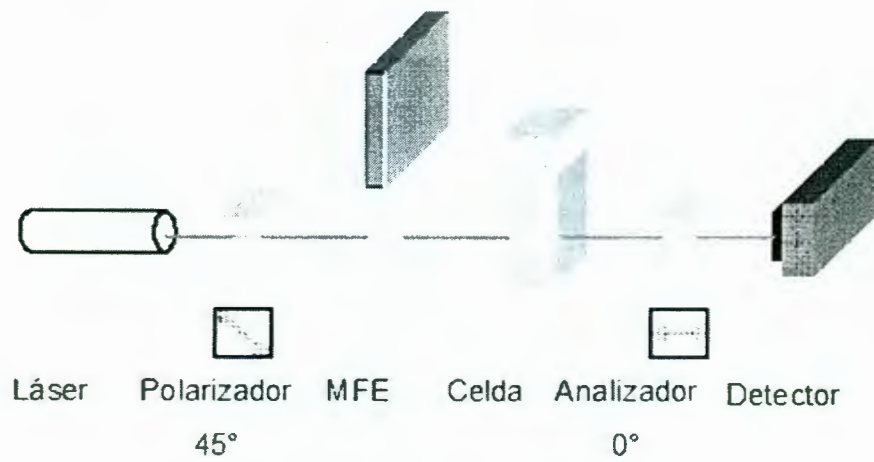


Figura 4. Diseño del Equipo.

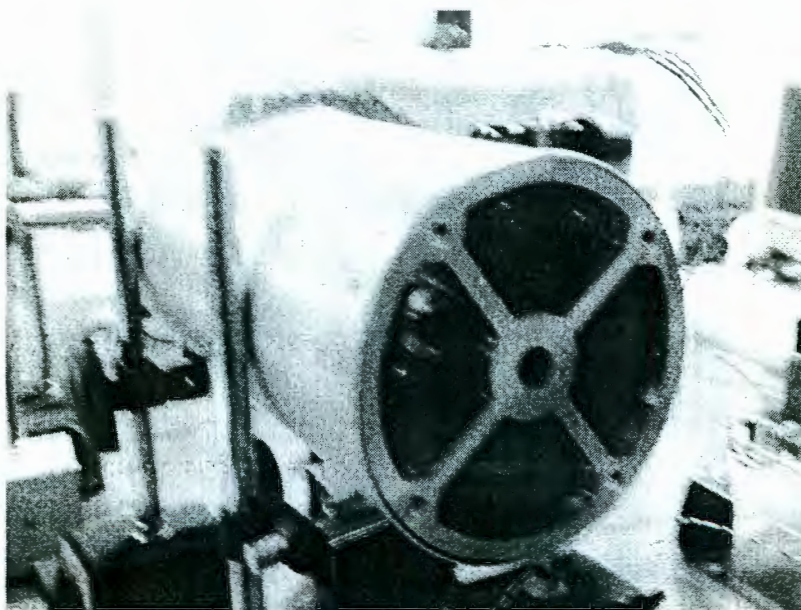


Figura 5. Cámara de Calentamiento Convectivo.





Figura 6. Aro de Aluminio.

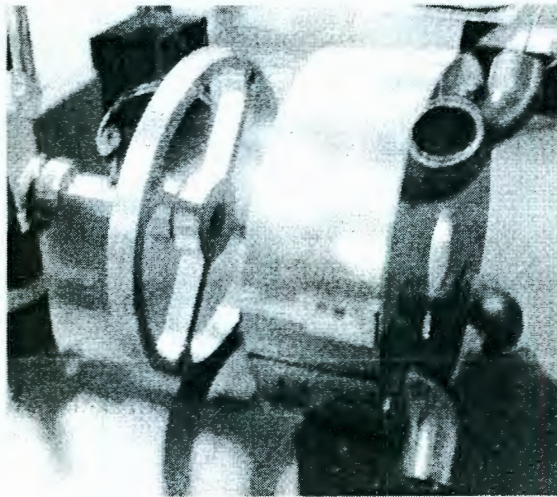


Figura 7. Tapa de la Cámara.

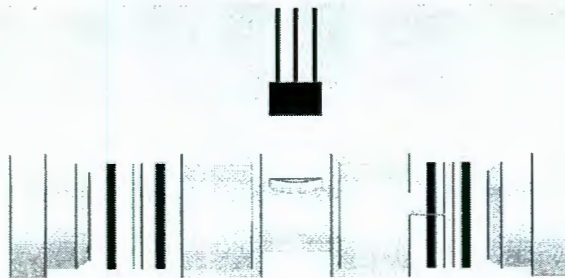


Figura 8. Celda Calentamiento Convectivo.

## Calentamiento Óhmico

Para el calentamiento óhmico se uso una celda (Figura 9) con paredes de acero inoxidable usadas como electrodos de 4cm. de largo y 3cm. de alto con una base y paredes de vidrio el control de temperatura se realizó por medio de un equipo.

### V.1.3 Métodos

#### Calentamiento convectivo

Se introdujo la muestra en la celda y se puso dentro de la cámara de calentamiento, se ajusto el láser para que el haz quede justo en el centro del lente del detector, se ajustó la intensidad para que la señal nos de valores en el lock-in de 5.00 a 5.20, Lo mismo se hizo para el display de unidades equivalentes a la rotación óptica en el lock-in, para evitar que se saturara.

Se colocaron las rampas de temperatura (Figura 10) en el software lab. view, (estas rampas se establecieron ya que fueron las que dieron mejores resultados en pruebas preliminares). La rampa que se uso fue de 5° C por minuto. Y las temperaturas inicial y final fueron 30 y 85° C respectivamente.

#### Calentamiento óhmico

Se puso la muestra en la celda y se ajustó el láser para que pasara justo en el centro de la ventana evitando que el rayo pase por el termopar, se programó el equipo para que siguiera una rampa de temperatura de 5° C por min.



Figura 9. Celda calentamiento óhmico.

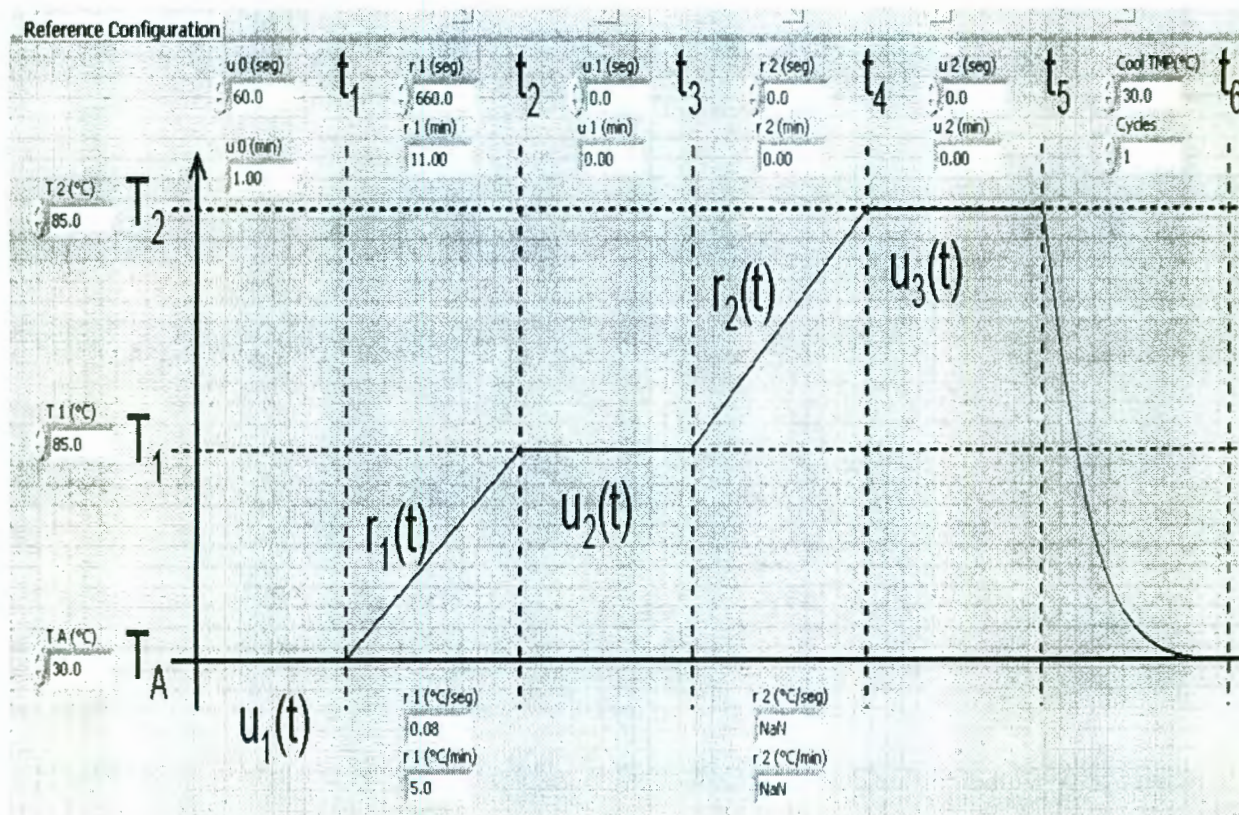


Figura 10. Diagrama Lab View.



## Análisis de datos

El programa lab view produce una lista de datos, los cuales se grafican usando OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation, Northampton, Massachussets, E.U.). Se realizaron regresiones lineales para cada segmento de la curva y después se obtuvo el punto de intersección por un sistema de ecuaciones.

### V.2 Electroforesis

#### V.2.1 Preparación de Soluciones

##### Muestras de APS

Se preparan dos muestras de APS de la misma forma que se hizo para realizar las mediciones ópticas. Una fue sometida al tratamiento convectivo con las mismas condiciones utilizadas durante el experimento y la otra fue sometida al tratamiento óhmico igualmente sin cambiar las condiciones a las del experimento.

##### Marcadores

Se utilizaron como marcadores las dos proteínas contenidas en el suero la  $\alpha$ -LA 90% (marca Biorad laboratorios Inc., Hercules California, E.U ) y la  $\beta$ -LG 91%( Biorad ) , así como un marcador de bajo peso molecular (Biorad).

##### Amortiguador Tris-CI/SDS 4x, pH 8.8

Se disolvieron 4.5 g de la base Tris (Biorad) en 10 ml de agua destilada se ajusto el pH a 8.8 con una solución 1M de HCl , y se aforó a 25 ml, se pasó por un filtro de 0.45  $\mu$ m posteriormente se le adicionó 0.1g de SDS.

##### Amortiguador SDS 1x

Se mezclaron 25 ml Tris-CI/SDS 4x, 20 ml de glicerol (Biorad) ( 20% v/v ) 4g SDS

(Biorad) 2 ml de 2-mercaptoetanol (Karal) 1mg azul de bromofenol, y se adicionó 100 ml de agua destilada.

#### Amortiguador de electroforesis SDS (pH 8.3)

Se pesaron 3.77 g de la base Tris (Biorad) 18 g de glicina y 1.25 g de SDS y se disolvieron en 250 ml de agua destilada.

#### V.2.2 Materiales

Se utilizó una cámara de electroforesis Biorad (modelo Protean, Biorad, Laboratorios Inc., Hercules, California, E.U. ) para correr los geles, y una cámara tipo sándwich para prepararlos.

#### V.2.3 Métodos

Se preparó el gel de separación al 15 %T de acrilamida en un recipiente, se adicionaron 7.5 ml de una solución al 30% acrilamida 0.8% bisacrilamida, se vertieron 3.75 ml de Buffer Tris-Cl/SDS pH 8.8 4x, 3.75 ml de agua grado HPLC, Se mezcló y se desgasificó con una bomba de vacío. Posteriormente se añadieron 0.05 ml de una solución 10% (w/v) de persulfato de amonio y 0.01 ml de TEMED (Biorad). Esta solución se vació en la cámara de preparación de geles tipo sándwich (Biorad) previamente armada, hasta que la solución llene  $\frac{3}{4}$  partes de la cámara, se le adiciono alcohol isoamílico para evitar que la solución de acrilamida este en contacto con el aire y esta polimerize. Después de que polimerizó se quitó el alcohol isoamílico y se secó perfectamente la cámara y el gel. Se preparó el gel concentrador ( 3.9%T de acrilamida ). Se mezclaron 0.65 ml de solución 30% acrilamida/0.8% bisacrilamida, se adicionaron 1.23 ml de Buffer Tris-Cl/SDS pH 8.8 4x, 3.05 ml de agua grado HPLC, Se mezcló y se desgasificó con una bomba de vacío. Posteriormente se añadieron 0.05 ml de una solución 10% (w/v) de persulfato de amonio y 0.01 ml de TEMED. Y se añadió a la cámara sobre el gel de separación y se puso el peine para muestras.



Una vez solidificado el gel se desmonta el contenedor de vidrio para geles tipo sándwich y se instala con todo y gel en la cámara de electroforesis (Biorrad) y se añade el Buffer de Electroforesis SDS 1X, hasta que este cubra totalmente el gel. Se añadieron las muestras por medio de una micro pipeta de 10µl con puntas capilares, poniendo en el primer pozo el marcador de bajo peso molecular (Biorrad) y en el último, un marcador de alto peso molecular (Biorrad), en los espacios de en medio se colocaron las soluciones de proteína junto a un marcador de proteína pura  $\alpha$ -LA 90% (Biorad) y la  $\beta$ -LG 91%(Biorad).

Las muestras fueron preparadas diluyendo una alícuota 1:1 ( v/v ) con simple buffer 2x, y fueron calentadas a 70° C durante 2 min. en tubos Eppendorf, se tomaron con micro pipeta 10 µl. de la solución y se colocaron en el pozo correspondiente.

Se conecto la cámara a la fuente de poder y se le hizo pasar una corriente constante de 10 mA hasta que las marcas azules llegaron al gel de separación, en ese momento se incrementó la corriente a 15 mA hasta finalizar.

Se retiró el sándwich de vidrio que contiene al gel, se introdujo en una tina con agua donde se separó cuidadosamente el gel del vidrio, éste se puso en un recipiente de plástico y se le añadió la solución fijadora, se dejó en agitación durante 30 min. Posteriormente se tiró dicha solución, se lavó con agua destilada y se agregó la solución teñidora de azul de coomassie durante 3 horas, por último se lavó y se le puso la solución desteñidora hasta que el color azul desapareció del gel.

### V.3 Granulometría

#### V.3.1 Materiales

Se utilizo un granulometro modelo 1064 (Marca CILAS Madison, Wisconsin, E.U.)  
Figura 11 con dos diodos láser montados en fibras a una longitud de onda de



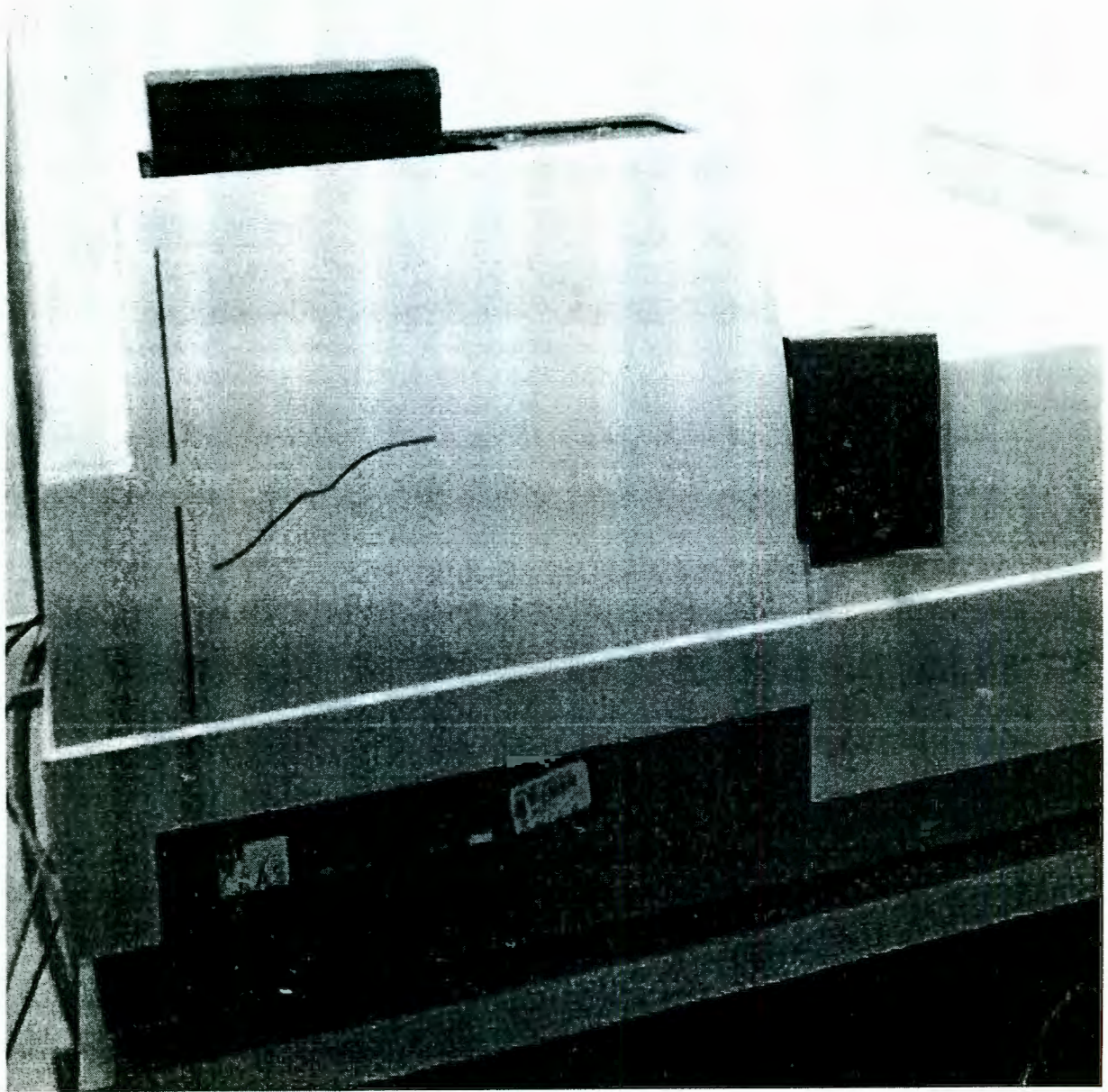


Figura 11 Granulometro CILAS 1064.

830nm y 3mW, el diámetro del láser fue de 15mm modulado a 400Hz, el detector es un fotodiodo multicomponente silicon con tres celdas independientes, la velocidad de rotación de la bomba fue ajustada a 120 rpm.

### V.3.2 Métodos

Se abrió el programa "The particle expert". Para ver en pantalla un esquema grafico del sistema.

Se verifico que el contenedor central tuviera agua destilada, agregándola hasta que en la pantalla del esquema se observo el contenedor lleno (color azul).

Se realizo la medición asegurándose de activar el icono que haga circular la solución en el sistema mediante la bomba peristáltica.

Es posible activar el uso de ultrasonido en la solución (la frecuencia es fija).

Antes de agregar la solución se midió, la señal de fondo o línea base (background) con el agua sola. La intensidad de señal obtenida siempre estuvo arriba de las 7000 unidades.

Se Agrego muestra y se apretó el botón de sample measurement.

Se procesaron los datos en el software "the particle expert" en el que se obtuvo la distribución de tamaño de partícula.

Se enjuago 3 veces el sistema antes de agregar otra muestra.



## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### VI.1 Rotación Óptica

Al someter el aislado proteínico de suero (APS) a calentamiento en el equipo de monitoreo de rotación óptica se obtuvieron termogramas que representan el cambio en la rotación óptica de una solución a lo largo del tiempo.

En la Figura 12 A se puede observar el comportamiento de una solución de APS-90 (90% de contenido de proteína) al ser calentada. Antes de  $\sim 63^\circ\text{C}$  no se observa ningún cambio significativo en la señal relativa a la rotación óptica de la solución. Alrededor de los  $64^\circ\text{C}$  comienza un aumento gradual y de pendiente sostenida de la señal relativa a la rotación óptica. Al llegar a una temperatura aproximada de  $76^\circ\text{C}$  se presenta un segundo cambio de pendiente en el aumento de la señal relativa a la rotación óptica. Cuando se llega a los  $80^\circ\text{C}$  de temperatura, el valor de la señal relativa a la rotación óptica disminuyó drásticamente hasta llegar a cero (datos no mostrados). Se encontró que esta disminución en la señal no se debe realmente a un descenso en la rotación óptica del sistema, sino más bien a una pérdida de transmisión de luz, ya que la solución se vuelve turbia impidiendo de esta manera la medición de la señal relativa a la rotación óptica. De acuerdo al termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) ( Figura 12 C), reportada por (Vázquez, 2002), el primero y segundo cambios de pendiente observados se pueden deber a la desnaturalización de la  $\alpha$ -LA y  $\beta$ -LG respectivamente, mientras que la pérdida de señal se puede deber a la formación del complejo  $\alpha$ -LA- $\beta$ -LG.

Aunque los cambios en la señal relativa a la rotación óptica son evidentes al observar la grafica de puntos ( Figura 12 A), en este trabajo se necesitaba poder calcular con mayor precisión y exactitud los valores de temperatura exactos de los cambios observados, para poder comparar estos cambios bajo diferentes condiciones. Al realizar el procesado de datos por medio de regresión lineal (ver



sección de materiales y métodos), podemos observar claramente y de manera más objetiva los cambios de pendiente que marcan lo que puede ser el inicio del cambio de conformación de cada proteína ( Figura 12 B). En el resto del trabajo solo se mostrarán las gráficas de los datos procesados por esta metodología.

Se ha reportado que la desnaturalización de la  $\alpha$ -LA se lleva a cabo a 62° C. (Hollar y Parris, 1995). Prabakaran y col., (1997) publicaron que la desnaturalización de la  $\alpha$ -LA se lleva a cabo después de sobrepasar los 60° C. Por otro lado (Zhang y col., 2004) afirman que la  $\alpha$ -LA no sufre cambios de conformación sino hasta una temperatura de 67° C. (Bylund, 1995) menciona que esta proteína comienza a desnaturalizarse a 65° C y que esta desnaturalización es total solamente al calentarse a 90° C durante 5 min. Por otro lado (Cairolí y col., 1994) reportaron que algunos cambios de conformación en la  $\alpha$ -LA comienzan a 50° C. Las variaciones que se observan en las temperaturas de desnaturalización reportadas pueden deberse a diferentes condiciones en que las mediciones fueron llevadas a cabo.

Se ha encontrado que la desnaturalización completa de la  $\beta$ -LG se lleva a cabo a 97°C. (De Wit, 1981) En otros estudios (De Wit y Klarenbeek, 1984) publicaron que al calentar la  $\beta$ -LG a 68°C esta comienza a cambiar de conformación. (Hollar y Parris, 1995) mencionan que esta proteína se desnaturaliza a 78°C. Cada monómero de  $\beta$ -LG está compuesto por 162 residuos de aminoácidos y posee 2 enlaces disulfuro y un grupo sulfhidrilo libre (Kilara y Harwalkar, 1996). El calentamiento puede inducir cambios en la estructura terciaria a pH neutro. Estos cambios se caracterizan por un incremento en la exposición de los residuos aromáticos (Townend y col., 1969) y un aumento en la reactividad del sulfhidrilo libre. Así como un cambio conformacional a nivel estructura secundaria (Prabakaran y col., 1997).

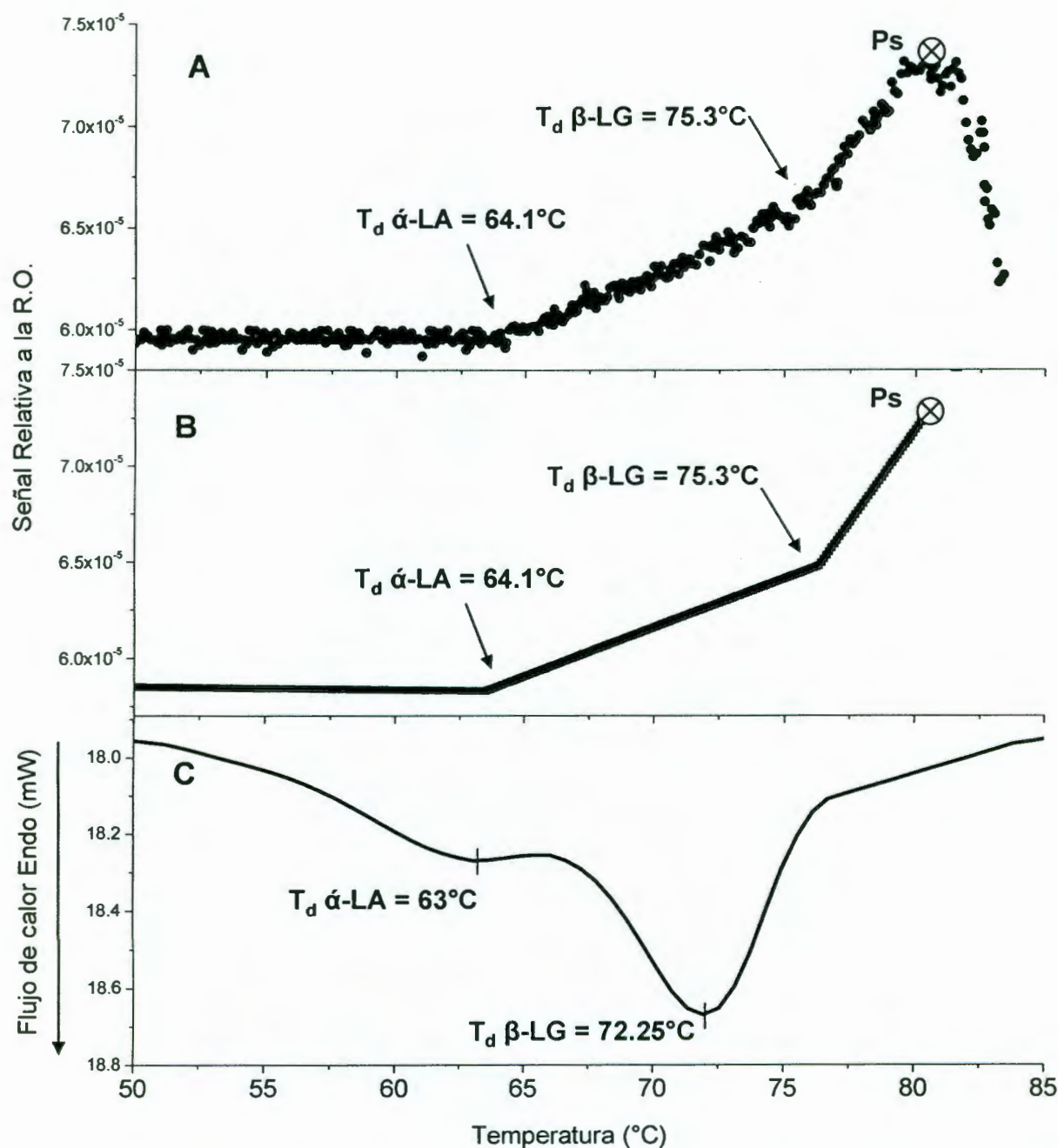


Figura 12. Termogramas de soluciones de  $\beta$ -LG y  $\alpha$ -LA. A) Solución de APS-90 al 2% w/v,  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ ,  $\text{pH}=6.1$  sin buffer; B) datos obtenidos en el termograma A procesados por medio de regresión lineal; C) termograma de calorimetría diferencial de barrido de una solución 1:2  $\alpha$ -LA: $\beta$ -LG,  $40 \mu\text{l}$  en cápsulas de alta presión, 15% w/v en buffer de fosfatos de potasio 10 mM,  $\text{pH}=6.4$ ,  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ .



La proximidad entre los grupos disulfuro y sulfhidrilo la hacen susceptible a la desnaturalización por calor (Kilara y Harwalkar, 1996), en donde ocurre una reacción que implica la formación de un componente más pesado asociado con la unión por medio de enlaces disulfuro e interacciones hidrofóbicas (Prabakaran y col., 1997).

Mientras que la  $\alpha$ -LA por si sola es incapaz de formar geles. Sin embargo, al estar en solución junto con la  $\beta$ -LG Favorece la formación de geles ya que la  $\beta$ -LG contienen grupos sulfhidrilos libres que interaccionan con la  $\alpha$ -LA y les confiere resistencia (Matsudomi y col., 1993). (Douglas y col., 1997) encontraron que las moléculas de  $\alpha$ -LA y  $\beta$ -LG pueden interactuar durante el calentamiento principalmente por medio de los enlaces disulfuro y las interacciones hidrofóbicas, sin embargo esto depende directamente de la concentración de ambas proteínas en la solución. La  $\alpha$ -LA no tiene ningún grupo tiol libre que pueda servir como punto de inicio para la reacción de agregación covalente. Es por eso que la  $\alpha$ -LA no puede formar geles por si misma, por otro lado cuando esta se encuentra con  $\beta$ -LG esta proporciona los grupos tiol libres necesarios para iniciar la reacción de agregación que va a terminar por formar fibras, que forman un gel turbio (Hambling y col., 1992).

Los cambios observados en el valor de la señal relativa a la rotación óptica fueron detectados gracias a que las proteínas mayoritarias del APS-90 utilizado están constituidas de aminoácidos que contienen carbonos quirales, los cuales presentan propiedades ópticas al desviar el plano de la luz polarizada.

La actividad óptica de la proteína es muy sensible a cualquier cambio estructural, y aun más cuando su conformación cambia por completo como ocurre en la desnaturalización (Barron, 2004). Este cambio puede ser variable dependiendo de la proteína y los enlaces que esta presenta (Campbell y Farbell, 2003).



Al calentarse y desnaturalizarse, las proteínas del suero lácteo sufren un cambio radical en su estructura, lo que se refleja en un reacomodo de los grupos quirales y en una aportación diferente de los mismos a la rotación óptica total observada. El valor relativo a la rotación óptica tiende a incrementarse debido a que al desnaturalizarse, muchos de los grupos quirales que se encontraban ocultos son expuestos a la interacción con el rayo de luz polarizada, aumentando así el valor total de la señal relativa a la rotación óptica observada (Lucena y col., 2007).

#### VI.1.1 Efecto del calentamiento convectivo

Se puede observar como en la Figura 13 A el cambio en la conformación de la  $\alpha$ -LA fue a los 63.9° C que no difiere en los rangos reportados por otros autores. La  $\beta$ -LG inicio su cambio de conformación a 76.2 °C, temperatura que coincide con la temperatura encontrada por (De Wit, 1981) de 74.2 °C. Se puede ver que la línea base (desde el inicio hasta que ocurre un cambio de pendiente) es casi horizontal, lo que nos representa que a ese rango de temperaturas realmente no ocurren cambios importantes en la rotación óptica de la solución.

El termograma de la Figura 13 C se realizo bajo las mismas condiciones que el de la Figura 13 A con la diferencia que esta solución se le agrego 1% dextrosa para evaluar el efecto de este azúcar al calentar la solución, los resultados fueron muy interesantes, ya que se pudo observar un corrimiento en las temperaturas de desnaturalización de ambas proteínas (Cuadro 3). La temperatura a la que  $\alpha$ -LA comienza a cambiar de conformación es 63.4°C un grado mayor a la presentada en la solución donde no se utilizó, esto respalda los datos encontrados por (Kulmyrzaev y col., 2000) que reporta que utilizando un 10% de dextrosa la temperatura a la cual inician los cambios conformacionales aumenta poco mas de 1°C. Lo mismo ocurrió con la  $\beta$ -LG.

En la Figura 13 E se muestra el termograma de una solución de pH 6.2 utilizando 2% de APS-90 en solución y añadiendo 1% de fructosa.

Señal Relativa a la Rotación óptica

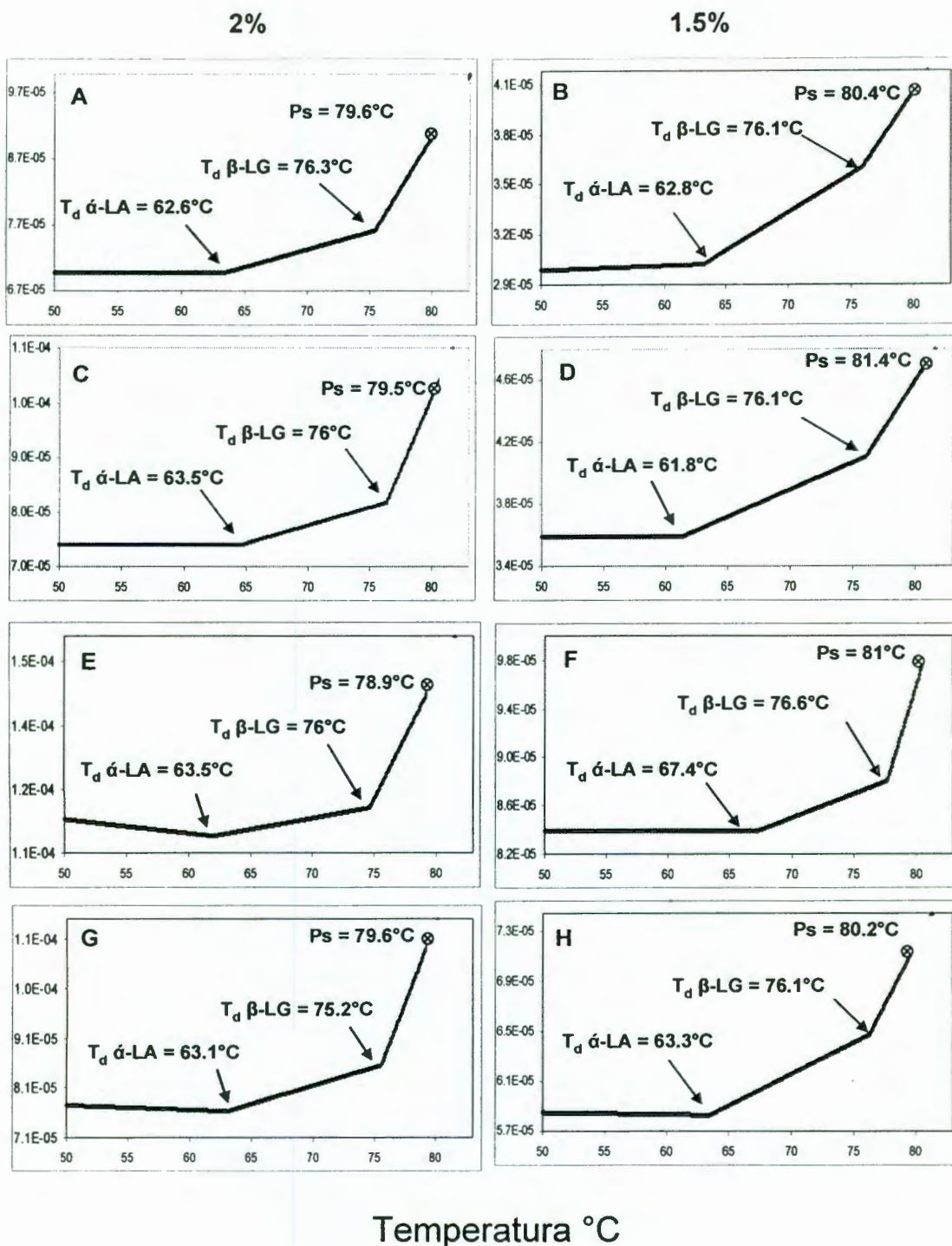


Figura 13. Termogramas de soluciones de APS-90 en buffer de fosfatos 50mM pH=6.1, tratadas con calentamiento convectivo a 5°C/min. A,B=sin azúcar; C,D=dextrosa;E,F=fructosa;G,H=sorbitol.



Esta última es la posible causa de un comportamiento muy singular, ya que la línea base es una diagonal con pendiente negativa muy pronunciada y diferente a la observada en los termogramas que no contenían este azúcar. Además, el cambio de conformación de la  $\alpha$ -LA se desfasa de 62 °C a 67.4°C, (Cuadro 3) esto se puede deber a dos cosas, la primera es que la fructosa esta protegiendo a la proteína, evitando que cambie de conformación hasta temperaturas más altas. Y la segunda es que la fructosa al ser levógira, o tener una rotación negativa, contrarrestando la rotación positiva de la proteína y provocando que la solución tenga valores cada vez mas negativos de rotación óptica, haciendo imposible observar el cambio real de la rotación de la proteína hasta mucho después de que esta haya ocurrido. En cualquiera de los dos casos habría que realizar más experimentos para comprobar lo que realmente esta sucediendo. En cuanto a la  $\beta$ -LG se puede observar como el inicio de su cambio de conformación se observa fácilmente y sin cambio con respecto a la solución sin azúcar añadido (Figura 2 A), lo que nos podría hacer pensar que la fructosa no protege de la desnaturalización, sino más bien nos impide ver el cambio de conformación de la  $\alpha$ -LA.

En la Figura 13 G se agrego a la solución 1% de sorbitol, este no provoca que el comportamiento de la solución cambie significativamente por lo menos bajo estas condiciones. Esto se puede deber a que el sorbitol presenta un valor de rotación óptica cercano a 0 (Gutierrez, 1995), puede ser por esta razón que este termograma es el más parecido al obtenido de la solución sin azúcar añadido (Figura 13 A). No existen estudios reportados con proteína y sorbitol. Un dato importante es que al contrario de la dextrosa y fructosa utilizadas en el experimento, el sorbitol causa un corrimiento del cambio de conformación de la  $\beta$ -LG pero hacia temperaturas menores, 61.2 °C aproximadamente.

En la Figura 13 B se obtuvieron prácticamente los mismos resultados utilizando la concentración de 1.5% que la de 2%, esto en cuanto a el inicio del cambio de conformación de ambas proteínas. Que al mismo tiempo coinciden con los de la



bibliografía reportada anteriormente. En la grafica Figura 13 D podemos observar como al contrario de lo que ocurrió en la concentración de 2% no retraso el cambio de conformación, de la  $\beta$ -LG, obtuvimos que el cambio fue 2°C debajo de lo esperado, y de lo obtenido por (Prabakaran y col., 1997). Habría que realizar más estudios a diferentes concentraciones de APS y de Dextrosa para poder tener conclusiones más firmes. El comportamiento de los termogramas de soluciones de proteína a pH = 3.1 (Figura 14) fue muy diferente a los obtenidos a pH = 6. Esto pudo deberse a que se modificó el pH de la solución hasta acercarse al punto isoelectrico de la  $\alpha$ -LA.

La  $\beta$ -LG existe como un dímero estable entre pH 3.5 y 6.5 como lo menciona (Hambling y col., 1992) debajo de este pH la proteína ya no se encuentra como dímero estable. Esa es una de las posibles causas de la inestabilidad y variabilidad de los experimentos realizados a pH = 3.1.

En la Figura 14 A el cambio de conformación de la  $\alpha$ -LA comenzó aproximadamente a 62 °C que no difiere mucho al encontrado con estas mismas condiciones pero a pH de 6.2, sin embargo el inicio del cambio de conformación de la  $\beta$ -LG se desfasó 6 °C, de 76.1° a 70.9°C. Este decremento en la temperatura de desnaturalización cuando el pH está cercano al punto isoelectrico de la proteína ha sido reportado anteriormente (Hoffman y Van Mil, 1999). En otros estudios (Douglas y col., 1997) encontraron que a pH neutro las proteínas no interaccionan cuando se encuentran a temperaturas por debajo de 80 °C, pero a pH mas bajo estas pueden llegar a interaccionar a temperaturas mas bajas dependiendo de las condiciones, como el rango de pH, concentración de las proteínas, la interacción con otras proteínas, y otros compuestos.

Al contrario de lo que sucede en el termograma de dextrosa a pH de 6.2 (Figura 13) en el de la Figura 14 C este azúcar no retrasa el cambio de conformación de la  $\beta$ -LG ni de la  $\alpha$ -LA. Desafortunadamente, no se pudieron encontrar en la literatura reportes previos del efecto de la dextrosa a pH cercano a 3.1.

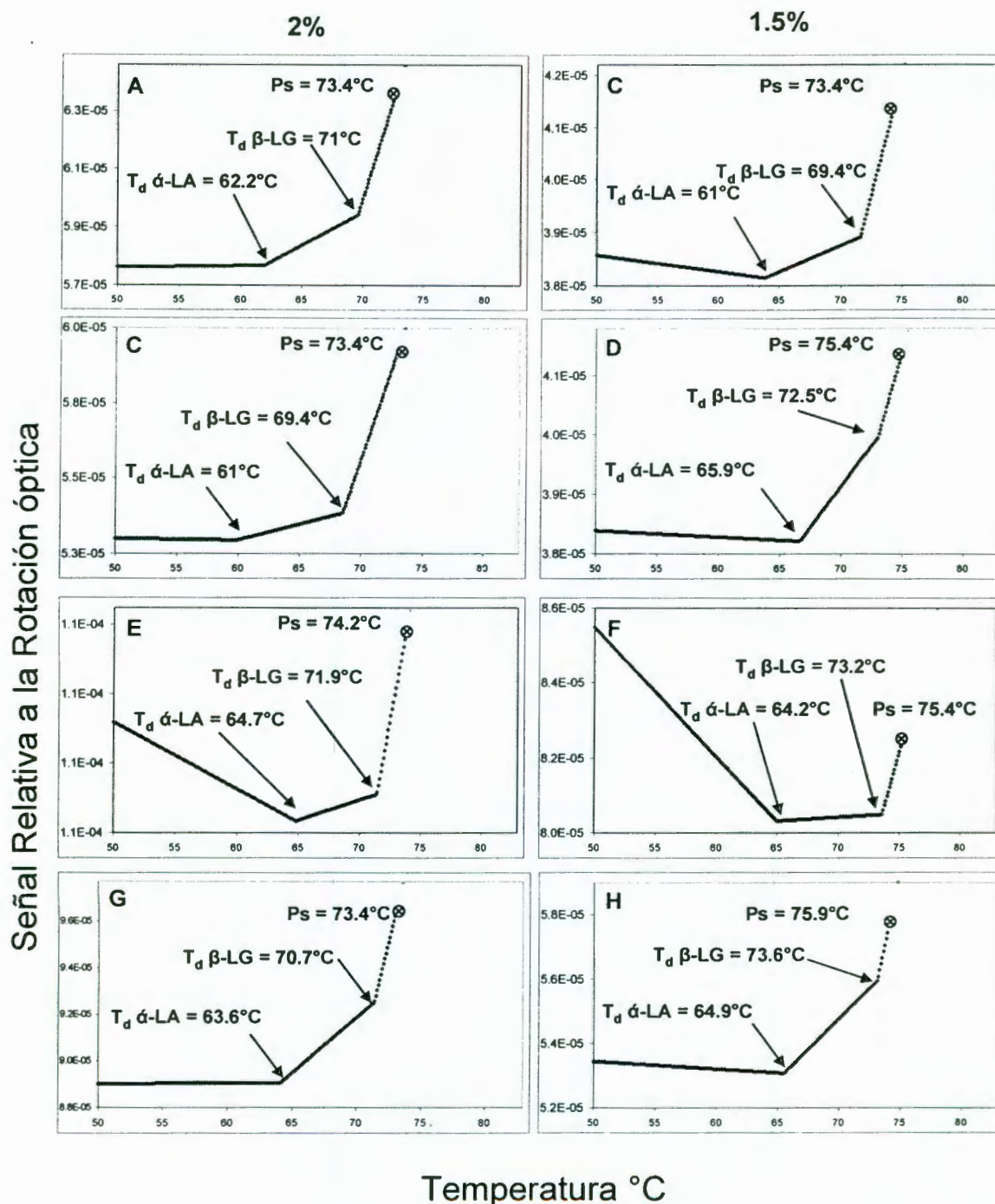


Figura 14 Termogramas de soluciones de APS-90 en buffer de fosfatos 50mM pH=3.1, tratadas con calentamiento convectivo a 5°C/min. A,B=sin azúcar; C,D=dextrosa;E,F=fructosa;G,H=sorbitol.



En el termograma mostrado en la Figura 14 E se pudo observar que la fructosa y el pH = 3.1 ocasionan que las temperaturas de desnaturalización se observen 4°C (Cuadro 3) antes que en los termogramas con fructosa a pH = 6.2 (Figura 13).

El termograma de la Figura 14 B tiene un comportamiento parecido al que ocurre en las soluciones que contienen fructosa a pH = 6.1 (Figura 13), ya que la línea base, en vez de ser una línea horizontal es una curva con pendiente negativa muy pronunciada. Lo más interesante de la Figura 14 D es que la temperatura de inicio del cambio de conformación de la  $\alpha$ -LA aumento 5 °C en relación a la obtenida a este mismo pH pero en concertación de 2% (Cuadro 3).

En la Figura 14 F se puede observar que el inicio del cambio de conformación de la  $\alpha$ -LA ya no es una línea con una pendiente positiva perceptible a simple vista, sino una línea casi horizontal, ya que el cambio total neto de la rotación óptica a esa temperatura es muy cercano a cero, y al iniciar el cambio de conformación de  $\beta$ -LG la podemos ver como esta pendiente casi horizontal cambia a una pendiente positiva. Estos resultados podrían estar sugiriendo que la fructosa tiene un efecto cancelador muy fuerte en la rotación óptica observada.

Las soluciones que contenían sorbitol Figura 14 H no mostraron cambios en las temperaturas de desnaturalización de las proteínas con respecto a las soluciones sin azúcar (Figura 14 A y B) (Cuadro 3). Esto puede deberse a que el sorbitol al ser un poliol y al estar sustituido en su mayoría por grupos OH, presenta una rotación óptica positiva apenas perceptible como lo publica (Blakley, 1981).

### VI.1.2 Efecto del Calentamiento Óhmico

En el calentamiento óhmico no fue posible utilizar un sistema buffer para control de pH ya que no fue posible obtener resultados reproducibles, ya que la señal óptica tenía demasiada inestabilidad. Debido a que el calentamiento óhmico depende del paso de corriente eléctrica a través de la solución, las sales del buffer alteran las propiedades eléctricas del sistema.



Esto provocó un enturbiamiento de la solución al paso de la corriente eléctrica, producido por la liberación de gases causada por la electrólisis de las sales del buffer, como lo reportaron (Lima y col., 1999). Otra posible razón del enturbiamiento es un fenómeno que ocurre al pasar electricidad a una solución que contiene iones y coloides en el cual por la adsorción preferente de algunos de los iones existentes en la disolución; los iones de signo opuesto que quedan en exceso en la disolución rodean a la partícula coloidal y forman con ella una doble capa eléctrica (Jirgenson y Straumanis, 1962). El pH de las soluciones de APS sometidas a calentamiento óhmico no se controló con un sistema buffer, sino solamente se midió al inicio del calentamiento, teniendo un valor de 6.1. (Salengke y Sastry, 2007) encontraron que al adicionar electrolitos a una solución y calentarla óhmicamente estos se mueven en dirección a la corriente aplicada, y este movimiento causa un enturbiamiento de la solución.

En general, para la mayoría de las corridas de calentamiento de soluciones de APS (con y sin azúcar) no se pudo observar el inicio de el cambio de conformación de la  $\beta$ -LG (Cuadro 4). Se ha reportado que el uso simultáneo de calor y electricidad hacen más termolábiles a las proteínas (Castro y col., 2004). Esta información sugiere que el complejo  $\alpha$ -LA- $\beta$ -LG por medio de calentamiento óhmico se forma a menor temperatura que en el calentamiento convencional, impidiendo ver el inicio del cambio de conformación de la  $\beta$ -LG, ya que el complejo se comienza a formar instantáneamente produciendo la pérdida de la señal óptica.

La Figura 14 A muestra el termograma de APS al 2% sometido a calentamiento óhmico sin la adición de ningún azúcar. Al igual que en los termogramas de calentamiento convectivo podemos observar como al inicio hay una línea más o menos horizontal, indicando estabilidad en la rotación óptica del sistema y sugiriendo que las proteínas no sufren ningún cambio a esas temperaturas. A una temperatura de 56° C se llega a un punto donde cambia la pendiente que nos indica el inicio del cambio de conformación de la  $\alpha$ -LA, y a una temperatura de 71.9 °C se observó el inicio del cambio de conformación de la  $\beta$ -LG. En este

termograma se puede observar como el inicio del cambio de conformación de la  $\alpha$ -LA se lleva a cabo a una temperatura de  $56^{\circ}\text{C}$  que es casi  $10^{\circ}\text{C}$  menor a la obtenida en el calentamiento convectivo (Cuadro 3, Cuadro 4 y Figura 12).

La Figura 14 C muestra un termograma de APS 2% con dextrosa añadida, el cambio de conformación de la  $\alpha$ -LA a  $51^{\circ}\text{C}$ , que es prácticamente el mismo al obtenido sin usar este azúcar. (Cuadro 4) Sin embargo, en este termograma no podemos observar el cambio de conformación de la  $\beta$ -LG, y la pérdida de señal que se llevó a cabo a  $73.7^{\circ}\text{C}$ ,  $4.3^{\circ}\text{C}$  menos que cuando no se utiliza dextrosa, y  $5.9^{\circ}\text{C}$  menos que cuando se calienta convectivamente (Cuadro 3 y Cuadro 4).

En la Figura 15 E, al igual que en los termogramas de calentamiento convectivo, se puede observar como la fructosa tuvo un fuerte efecto sobre la rotación óptica del sistema. La señal a temperaturas bajas se manifiesta como una recta de pendiente negativa. El inicio del cambio de conformación de la  $\alpha$ -LA es de  $53.5^{\circ}\text{C}$  y la pérdida de señal se da a  $74.5^{\circ}\text{C}$ , temperaturas que son menores a las obtenidas cuando no se utiliza ningún azúcar.

La Figura 15 G muestra que el sorbitol también disminuye los valores de temperatura del cambio de conformación de la  $\alpha$ -LA, y de la formación del complejo, lo cual no permite ver el inicio de cambio de conformación de la  $\beta$ -LG.

Al utilizar concentraciones de APS más bajas, se observó que los cambios de conformación presentan valores de temperatura por debajo del presentado por los termogramas realizados a esta concentración con diferentes azúcares.

Para fines comparativos, se calentaron convectivamente soluciones de APS al 2% y 1.5% (Figura 16) sin la adición de buffer para el control del pH. Se observó que el comportamiento de la señal relativa a la rotación óptica fue muy similar al de las pruebas de calentamiento convectivo con sistema buffer a  $\text{pH} = 6.1$ .



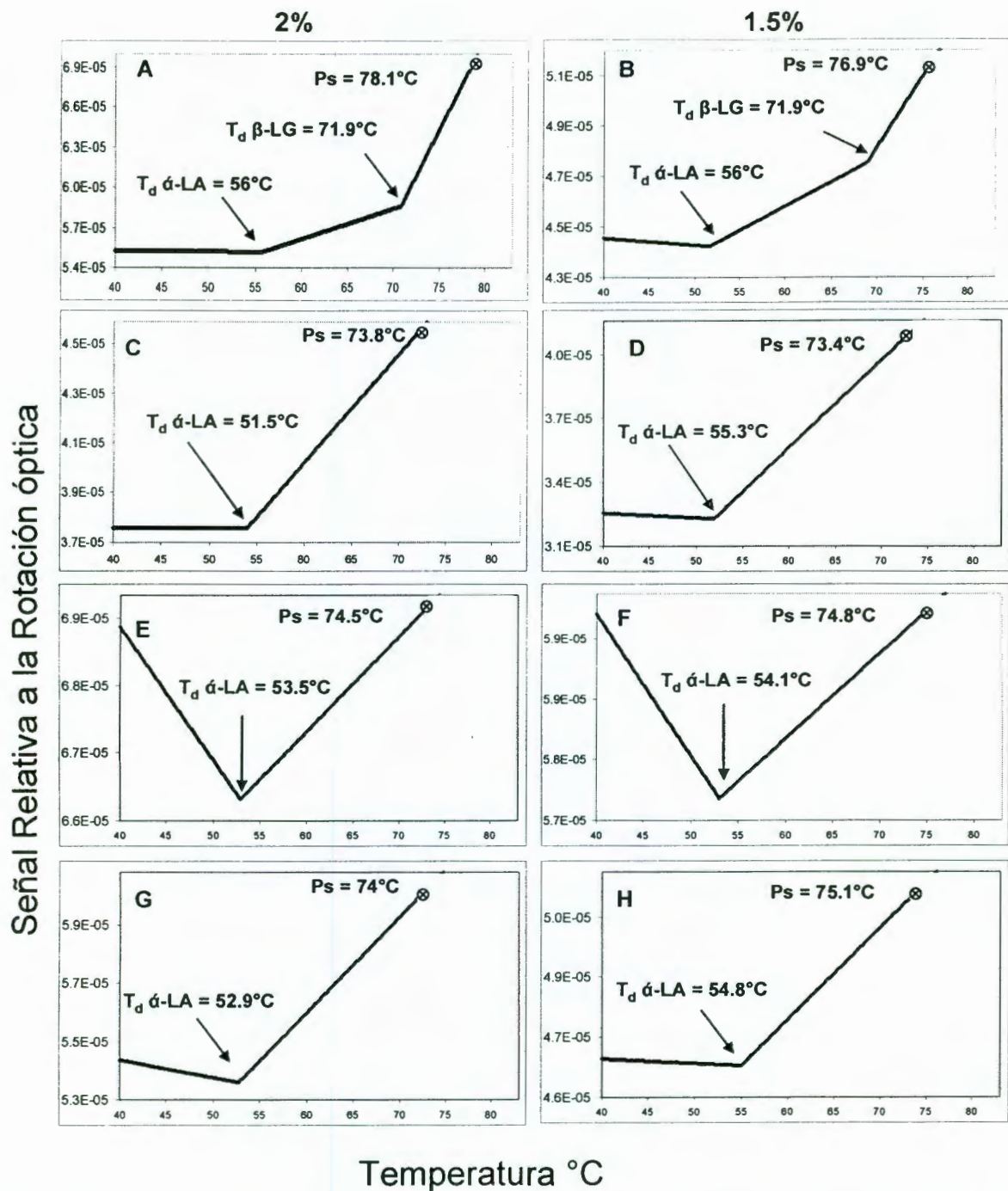


Figura 15. Termogramas de soluciones de APS-90 sin buffer con un pH inicial = 6.1 tratadas con calentamiento óhmico a 5 °C/min. A,B=sin azúcar; C,D=dextrosa; E,F=fructosa;G,H=sorbitol.



Los datos obtenidos de estas corridas sin sistema buffer fueron utilizados para comparar el efecto óhmico con el convectivo (Cuadro 4), ya que de esta forma se encuentran en igualdad de condiciones.

En el Cuadro 3 se puede observar que a pH 6.1 y en concentración 2% de APS-90 existen diferencias significativas entre las muestras que contienen diferentes tipos de azúcar, para el primer cambio de pendiente que corresponde a la desnaturalización de la  $\beta$ -LG, lo que nos podría estar indicando que a este pH los azúcares tienen diferentes efectos sobre la desnaturalización de esta proteína, se puede observar que en ambas concentraciones las soluciones que contienen dextrosa, bajan la temperatura del inicio de desnaturalización aproximadamente 1°C. El efecto de los azúcares en la desnaturalización de las proteínas de suero lácteo ya había sido estudiado por (Kumyzaev y col., 2000), quienes encontraron que al adicionar un 10% de sacarosa a la solución, la temperatura de la desnaturalización de las dos proteínas mayoritarias del suero aumenta en más de 1°C, lo que coincide con lo encontrado en este estudio para la  $\beta$ -LG, sin embargo en el caso de la  $\alpha$ -LA en este estudio se observó que a pH 6.1 no sufre ningún cambio en su temperatura de desnaturalización. Esto se puede deber a que en este estudio se utilizó dextrosa en vez de sacarosa.

El sorbitol por otro lado solo tuvo efecto en la solución de pH 6.1 y concentración de APS-90 2% en la cual bajo la temperatura de desnaturalización tanto de la  $\beta$ -LG como de la  $\alpha$ -LA cerca de 1°C, sin embargo en otras soluciones no existe diferencia estadísticamente significativa entre las soluciones que contienen este azúcar y las que no contienen ningún azúcar. Es por eso que no se le puede atribuir ningún cambio a las proteínas en la solución producido por este azúcar.

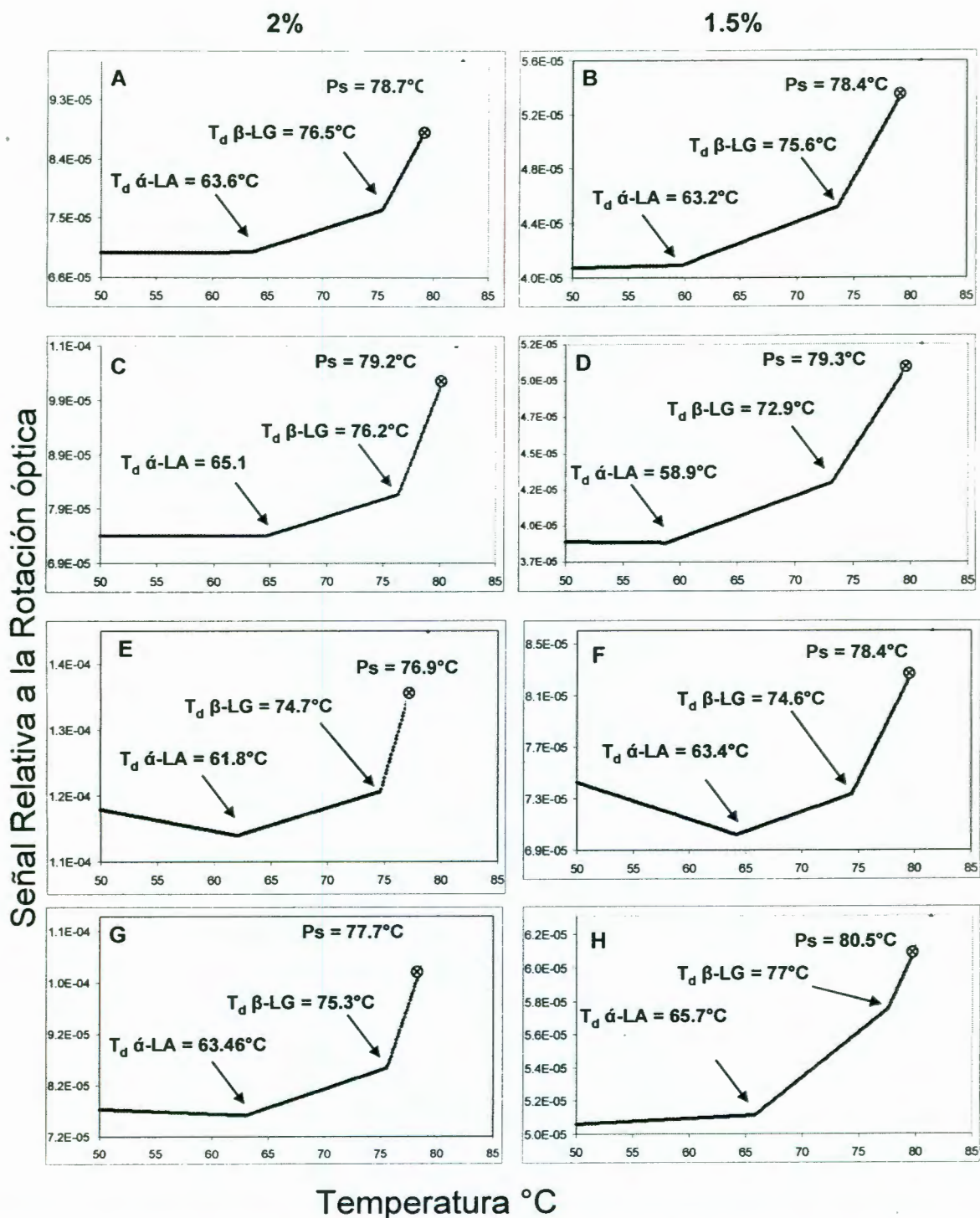


Figura 16 Termogramas de soluciones de APS-90 sin buffer a un pH inicial de 6.1 tratadas con calentamiento convectivo a 5°C/min. A,B=sin azúcar; C,D=dextrosa; E,F=fructosa; G,H=sorbitol.

Cuadro 3. Temperaturas de inicio del cambio de conformación y de pérdida de señal, para soluciones de APS-90 en buffer de fosfatos 50 mM, tratadas por medio de calentamiento convectivo.

pH	Concentración	Azúcar	Inicio cambio de conformación $\alpha$ -LA	Inicio cambio conformación $\beta$ -LG	Perdida de señal
6.1	2%	Sin azúcar	62.6 $\pm$ 0.4	76.2 $\pm$ 0.1	79.6 $\pm$ 0.6
		Dextrosa	63.5 $\pm$ 0.4	76.1 $\pm$ 0.1	79.5 $\pm$ 0.4
		Fructosa	67.5 $\pm$ 0.9	76.0 $\pm$ 0.3	78.9 $\pm$ 0.4
		Sorbitol	61.2 $\pm$ 0.6	75.2 $\pm$ 0.3	79.0 $\pm$ 0.3
	1.5%	Sin azúcar	62.8 $\pm$ 0.7	76.2 $\pm$ 0.3	80.4 $\pm$ 0.5
		Dextrosa	61.8 $\pm$ 1.2	76.1 $\pm$ 0.3	81.4 $\pm$ 0.5
		Fructosa	67.4 $\pm$ 0.6	76.6 $\pm$ 1.1	81.0 $\pm$ 0.8
		Sorbitol	63.3 $\pm$ 0.9	76.1 $\pm$ 0.7	80.2 $\pm$ 0.7
3.1	2%	Sin azúcar	62.2 $\pm$ 0.3	71.0 $\pm$ 0.5	73.4 $\pm$ 0.5
		Dextrosa	61.0 $\pm$ 1.0	69.4 $\pm$ 0.8	73.4 $\pm$ 1.0
		Fructosa	64.7 $\pm$ 1.3	71.9 $\pm$ 0.4	74.2 $\pm$ .5
		Sorbitol	63.6 $\pm$ 0.6	70.7 $\pm$ 1.0	72.7 $\pm$ 0.3
	1.5%	Sin azúcar	65.6 $\pm$ 1.0	71.6 $\pm$ 0.7	74.5 $\pm$ 0.3
		Dextrosa	65.9 $\pm$ 1.8	72.5 $\pm$ 0.8	75.4 $\pm$ 1.0
		Fructosa	64.2 $\pm$ 1.3	73.2 $\pm$ 0.4	75.4 $\pm$ 0.5
		Sorbitol	64.9 $\pm$ 1.5	73.6 $\pm$ 0.5	75.9 $\pm$ 0.5



Las soluciones de pH 3.1 tuvieron una pérdida de señal a temperaturas 5 °C mas bajas que las de pH 6.1, las proteínas interactúan diferente cuando se les cambia el pH, como lo describen (Hoffman y Van Mil, 1999) por otro entre pH 5 y 8.8 y demostró que a pH alcalino la desnaturalización es mas rapida (Law y Leaver, 2000), y publicaron que cuando las proteínas salen de su pH natural estas son mas sensibles a la temperatura y pueden desnaturalizarse mas fácilmente.

La perdida de señal en ambos valores de pH se presentó a mayores temperaturas en la concentración de de 1.5%. Esto se debe a que la formación del agregado  $\beta$ -LG- $\alpha$ -LA depende directamente de la concentración de ambas proteínas (Douglas y col., 1997), además de que a una mayor concentración de proteínas se formara un gel mas turbio y mas viscoso.

Se observó como en el calentamiento óhmico no fue posible identificar la temperatura de cambio de conformación de la  $\beta$ -LG. Esto se pudo deber a la interacción de los azúcares con la celda, o a la interacción entre la corriente y los azúcares. La desnaturalización se lleva acabo antes a causa del campo eléctrico generado por el calentamiento óhmico. (Castro y col., 2004) concluyeron que la destrucción de enlaces, interacciones hidrofóbicas, y enlaces iónicos de estructuras terciarias de las proteínas puede ser provocada por el paso de un campo eléctrico a través de la solución, cuando observaron que diferentes enzimas son desnaturalizadas a temperaturas menores cuando estas son sometidas a un calentamiento óhmico.

Por otra parte podemos ver que la variabilidad de las mediciones en el sistema en el calentamiento óhmico es muy grande, probablemente debido a la corriente que pasa por la solución. Sin embargo, fue posible encontrar diferencias significativas entre los tratamientos.. Para poder observar mejor los cambios presentados en el Cuadro 3 se graficaron todos los valores del inicio de la desnaturalización de la primera proteína. Estos se muestran en la Figura 17.

Cuadro 4. Temperaturas de inicio del cambio de conformación de ambas proteínas y de pérdida de señal, para una comparación entre el calentamiento convectivo y el óhmico.

Calentamiento	Concentración	Azúcar	Inicio cambio de conformación $\alpha$ -LA	Inicio cambio de conformación $\beta$ -LG	Perdida de señal
Convectivo	2%	Sin azúcar	63.6 $\pm$ 0.8	76.5 $\pm$ 0.4	78.7 $\pm$ 0.4
		Dextrosa	64.1 $\pm$ 0.6	76.2 $\pm$ 0.7	79.2 $\pm$ 0.4
		Fructosa	61.8 $\pm$ 0.3	74.7 $\pm$ 0.9	76.9 $\pm$ 0.7
		Sorbitol	63.4 $\pm$ 1.14	75.3 $\pm$ 0.2	77.7 $\pm$ 0.2
	1.50%	Sin azúcar	63.2 $\pm$ 1	75.6 $\pm$ 1	78.4 $\pm$ 0.6
		Dextrosa	58.9 $\pm$ 0.8	72.9 $\pm$ 0.8	79.3 $\pm$ 0.7
		Fructuosa	63.4 $\pm$ 0.8	74.6 $\pm$ 0.3	78.4 $\pm$ 0.2
		Sorbitol	65.7 $\pm$ 0.8	77.0 $\pm$ 1.1	80.5 $\pm$ 0.7
Óhmico	2%	Sin azúcar	56.0 $\pm$ 1.2	71.9 $\pm$ 1	78.1 $\pm$ 0.5
		Dextrosa	51.5 $\pm$ 2.2	N	73.8 $\pm$ 2.1
		Fructuosa	53.5 $\pm$ 1.6	N	74.5 $\pm$ 1.8
		Sorbitol	52.9 $\pm$ 1	N	74.0 $\pm$ 2.5
	1.50%	Sin azúcar	49.5 $\pm$ 1.95	68.6 $\pm$ 1	76.9 $\pm$ 1
		Dextrosa	55.3 $\pm$ 2.8	N	72.8 $\pm$ 1.4
		Fructuosa	54.1 $\pm$ 0.9	N	74.8 $\pm$ 1.6
		Sorbitol	54.8 $\pm$ 0.9	N	75.1 $\pm$ 1.8

N = No se observó

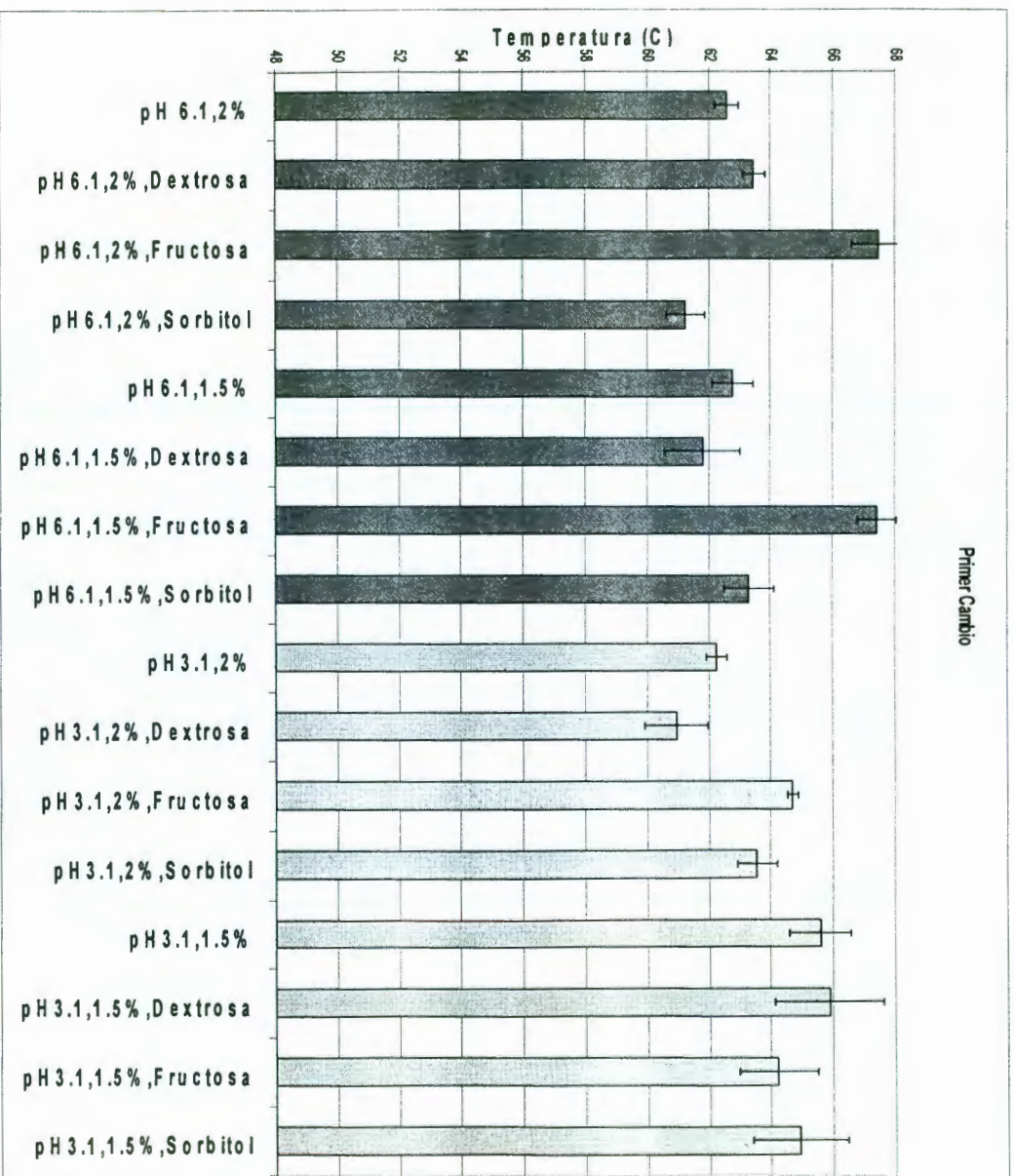


Figura 17 Comparación del primer cambio ocurrido en las soluciones tratadas por un calentamiento convectivo.



Se puede observar que en la concentración de 2% de APS-90 en todos los casos la temperatura de inicio de desnaturalización es mayor para el pH de 6.1 que para el de 3.1, sin embargo para la concentración de 1.5% de APS-90 en algunos casos es mayor y en otro no lo es. El pH influye directamente en la temperatura de desnaturalización de las proteínas al ser calentadas. Estudios realizados por (Law y Leaver, 2000) en proteínas de suero lácteo a diferentes valores de pH demostraron que en general que las proteínas de suero lácteo son más susceptibles a desnaturalizarse a valores de pH bajos ya que estas pierden su forma globular comienzan a cambiar de conformación y también comienzan a agregarse (Smits y Van Brouwershaven, 1980). Sin embargo se ha demostrado que la  $\beta$ -LG es mucho mas susceptible a desnaturalizarse cuando esta se encuentra a pH ácido, como lo publicó (Harwalkar, 1979) en sus experimentos realizados con  $\beta$ -LG a pH de 2.5, donde encontró que esta se desnaturaliza térmicamente a temperaturas hasta 10° C menores que cuando se encuentra en un pH neutro.

En la Figura 18 se presenta gráficamente la temperatura de desnaturalización de la  $\beta$ -LG, en la que si se puede observar claramente la diferencia en la temperatura de desnaturalización entre el pH de 3.1 y el de 6.1. Estos resultados concuerdan a los obtenidos por otros investigadores que realizaron estudios de desnaturalizó que la  $\beta$ -LG es la proteína del suero lácteo mas sensible a cambios de pH ya que su forma a pH neutro es como dímero, y cuando esta pasa a monómero se vuelve mas sensible a la desnaturalización térmica, En su estudio publicaron que a pH 4 y calentando suero lácteo durante 5 min a 90°C el porcentaje de desnaturalización de la  $\beta$ -LG subió un 35% a comparación con la solución a pH neutro. Por otro lado (Harwalkar, 1979) realizó experimentos usando  $\beta$ -LG aislada a pH de 2.5, encontrando que esta es mucho mas susceptible a la desnaturalización térmica. Ya que sus cambios conformacionales comienzan de 7 a 10° C antes que cuando se encuentra en un pH neutro dependiendo de la concentración.

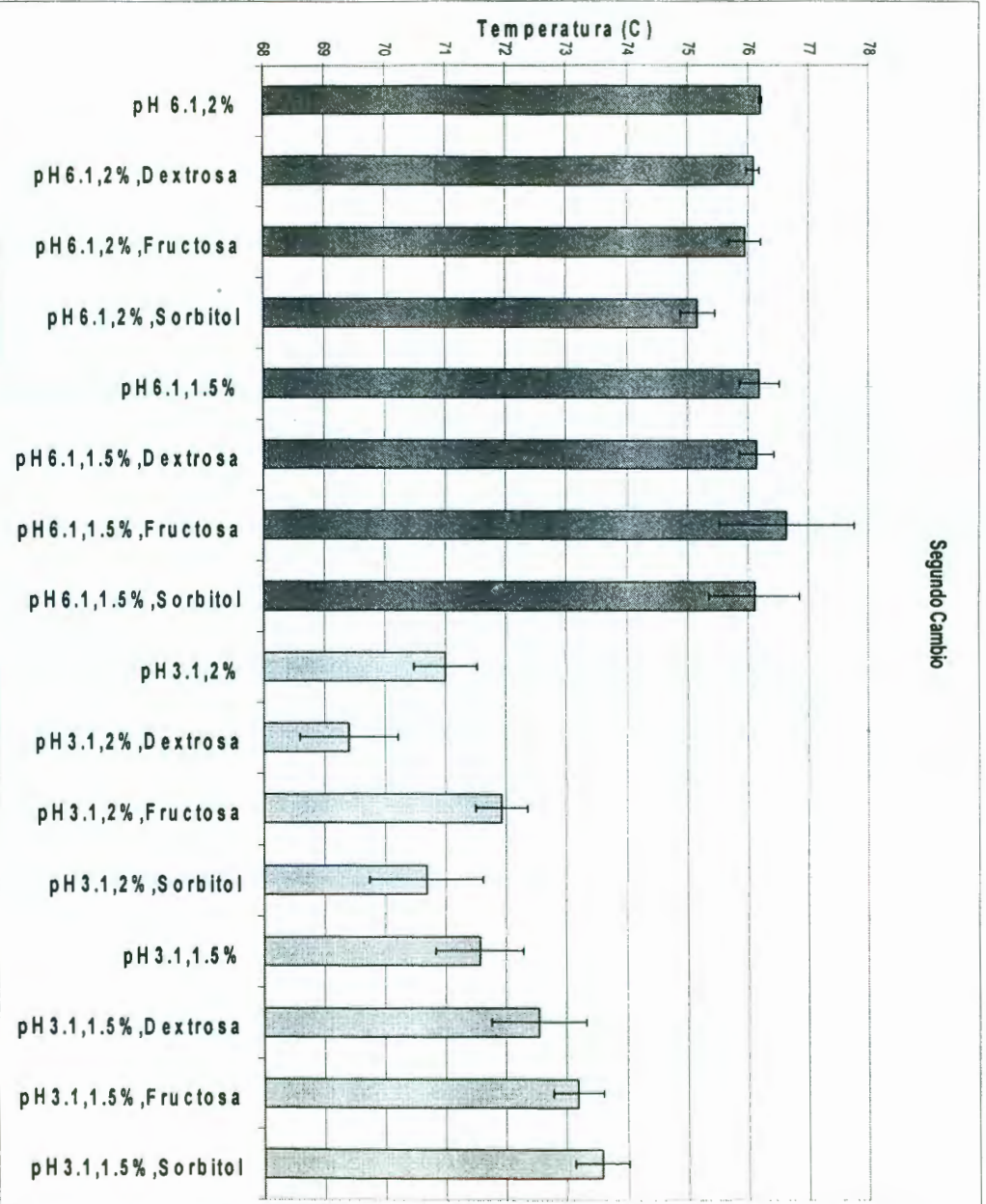


Figura 18 Comparación del segundo cambio ocurrido en las soluciones tratadas consecutivamente.



Al evaluar las temperaturas a las que se presenta la pérdida de señal óptica en las soluciones, encontramos que existen diferencias significativas entre las muestras con diferente pH y diferentes concentraciones, pero no se encontraron diferencias entre las temperaturas de las soluciones que contenían diferentes tipos de azúcares. En la Figura 19 se pueden observar claramente estas diferencias.

La diferencia que existe entre los valores de pH es enorme, y esta se puede deber a que al desnaturalizarse la  $\beta$ -LG a menor temperatura, esta comienza a formar el complejo con la  $\alpha$ -LA, a menor temperatura, por lo tanto el enturbiamiento de la solución viene a una menor temperatura.

La diferencia que existe entre las concentraciones se debe a que la formación del complejo  $\beta$ -LG-  $\alpha$ -LA es dependiente directamente a la concentración de proteína, como lo reportan (Hollar y Parris, 1995) y al tener una mayor concentración de proteína las interacciones entre ambas proteínas son mayores y por lo tanto este complejo se realiza antes.

Al comparar los dos tipos de calentamiento, se encontraron cosas muy interesantes, en el primer cambio que corresponde a la  $\alpha$ -LA se puede observar en la Figura 20 que existe una diferencia significativa entre los dos tratamientos.

Esta diferencia se puede deber directamente al campo eléctrico que genera el calentamiento óhmico ya que como publican (Castro y col., 2004) el campo eléctrico tienen muchos efectos sobre la estructura de proteínas, ya que causa un rearrreglo de enlaces no covalentes, como puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, y enlaces iónicos de la estructura terciaria, así mismo puede influenciar reacciones bioquímicas cambiando la conformación molecular, y fomentando las reacciones intramoleculares. Todos estos factores son determinantes en los cambios que sufre la proteína por desnaturalización, es por eso que esta diferencia de temperatura de alrededor de 10°C puede ser achacada al campo eléctrico formado por el calentamiento óhmico.



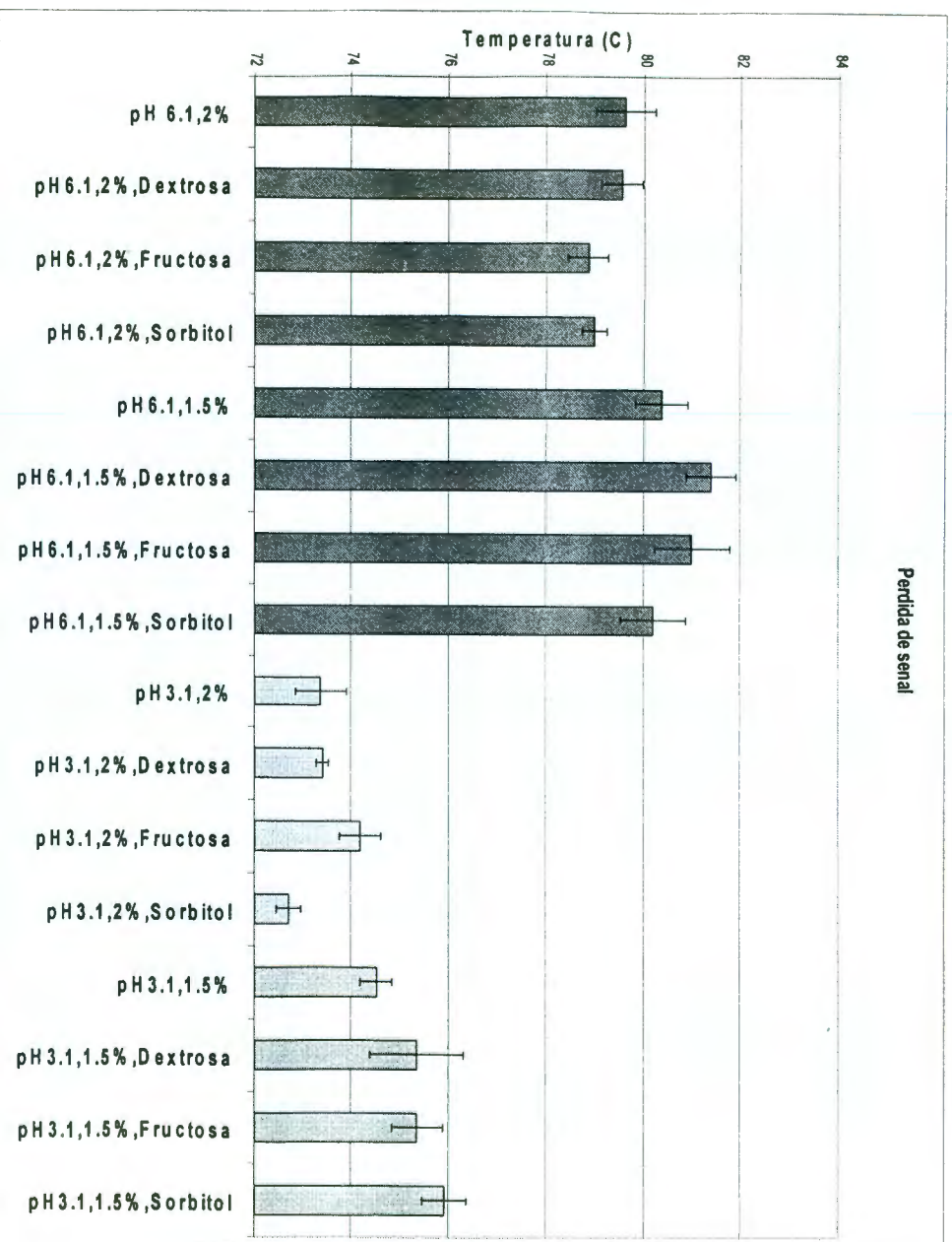


Figura 19 Comparación de la pérdida de señal ocurrida en las soluciones tratadas convektivamete.

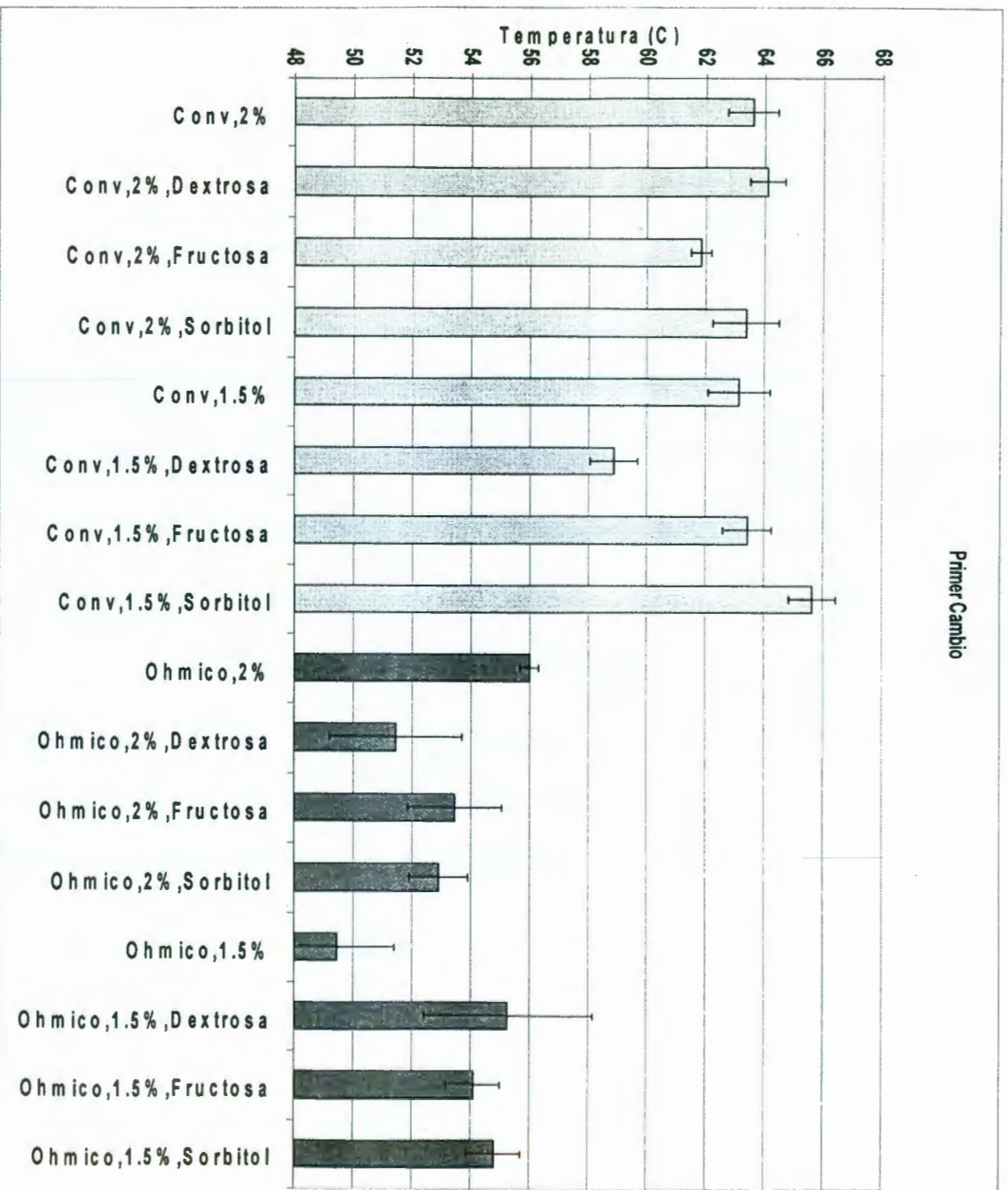


Figura 20 Comparación del primer cambio ocurrido en las soluciones donde se compararon ambos tratamientos.

En cuanto al segundo cambio que corresponde a la  $\beta$ -LG en la Figura 21 solo se pudo evaluar la diferencia solo en las soluciones en donde no se utilizó azúcar, por razones ya antes mencionadas.

En la Figura 22 se puede observar como la pérdida de señal en el tratamiento óhmico es significativamente menor que en el convectivo. Aquí se puede observar con más claridad como los azúcares afectan significativamente la solución, ya que como se mencionó antes estos tienen efectos sobre la turbidez de la solución cuando se le pasa una corriente eléctrica.

## VI.2 Electroforesis

El perfil electroforetico de ambos tratamientos (Figura 23 carril 2 para el convectivo y carril 3 para el óhmico) es muy similar, tanto para las proteínas mayoritarias de bajo peso molecular como lo son la  $\alpha$ -LA y la  $\beta$ -LG-90, como para las proteínas minoritarias de alto peso molecular, por lo cual no se podría decir que los tratamientos son diferentes por este método.

Podemos observar que el tratamiento óhmico no forma ningún complejo que difiera en peso molecular aparente al tratamiento convectivo, ya que se observan las mismas bandas para ambos tratamientos, (Oldfield y col., 2005) en sus experimentos tampoco pudieron diferenciar entre complejos formados a diferentes temperaturas, en suero lácteo por este mismo método.

Así mismo (Castro y col., 2004) experimentaron con enzimas comparando el calentamiento óhmico y convectivo, y realizaron pruebas de electroforesis tanto nativa como SDS-PAGE, para comprobar si se encontraban bandas diferentes en los tratamientos, pero al igual que en este caso no pudieron encontrar bandas diferentes en ninguna de las dos pruebas electroforeticas.



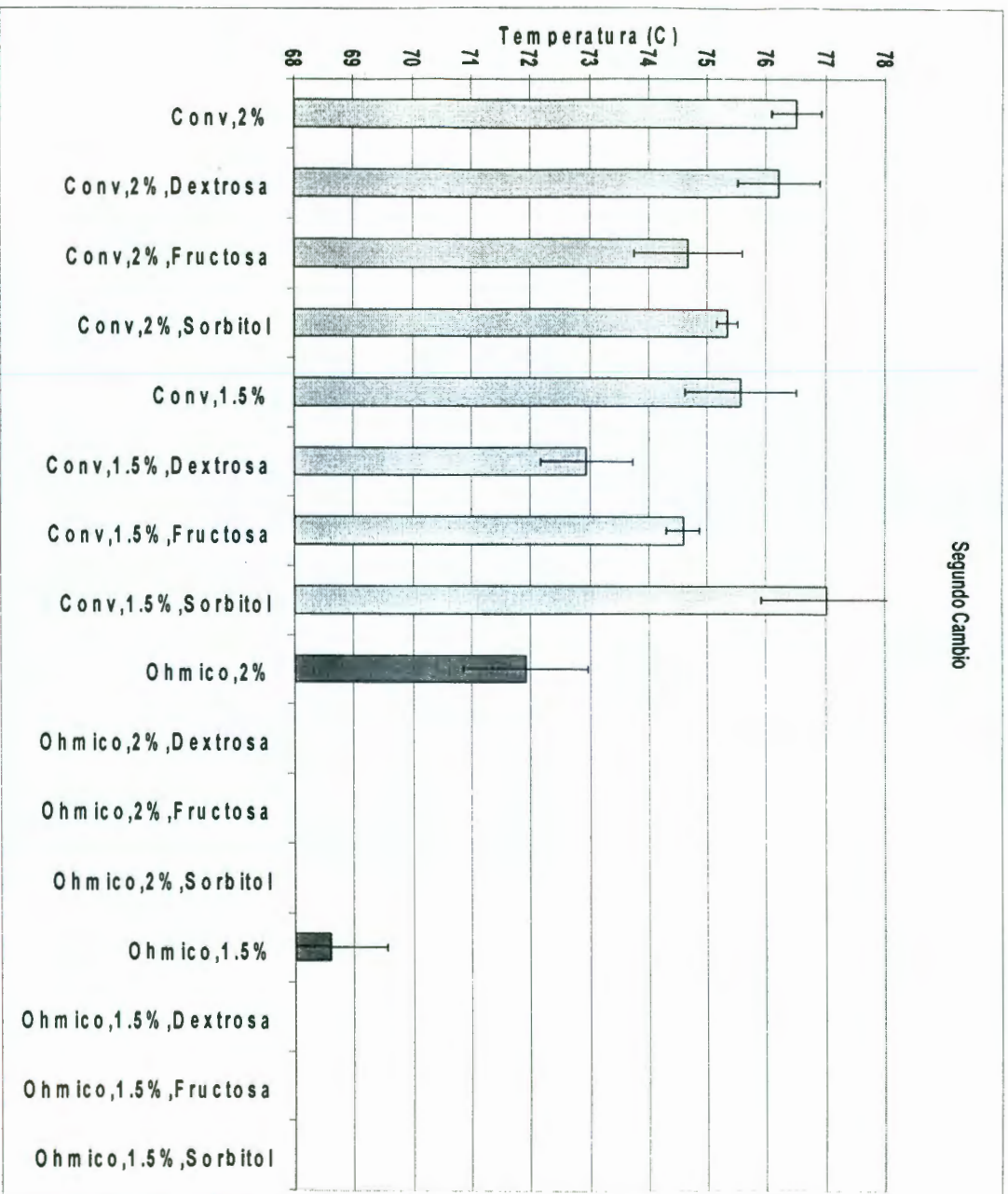


Figura 21 Comparación del segundo cambio ocurrido en las soluciones donde se compararon ambos tratamientos.

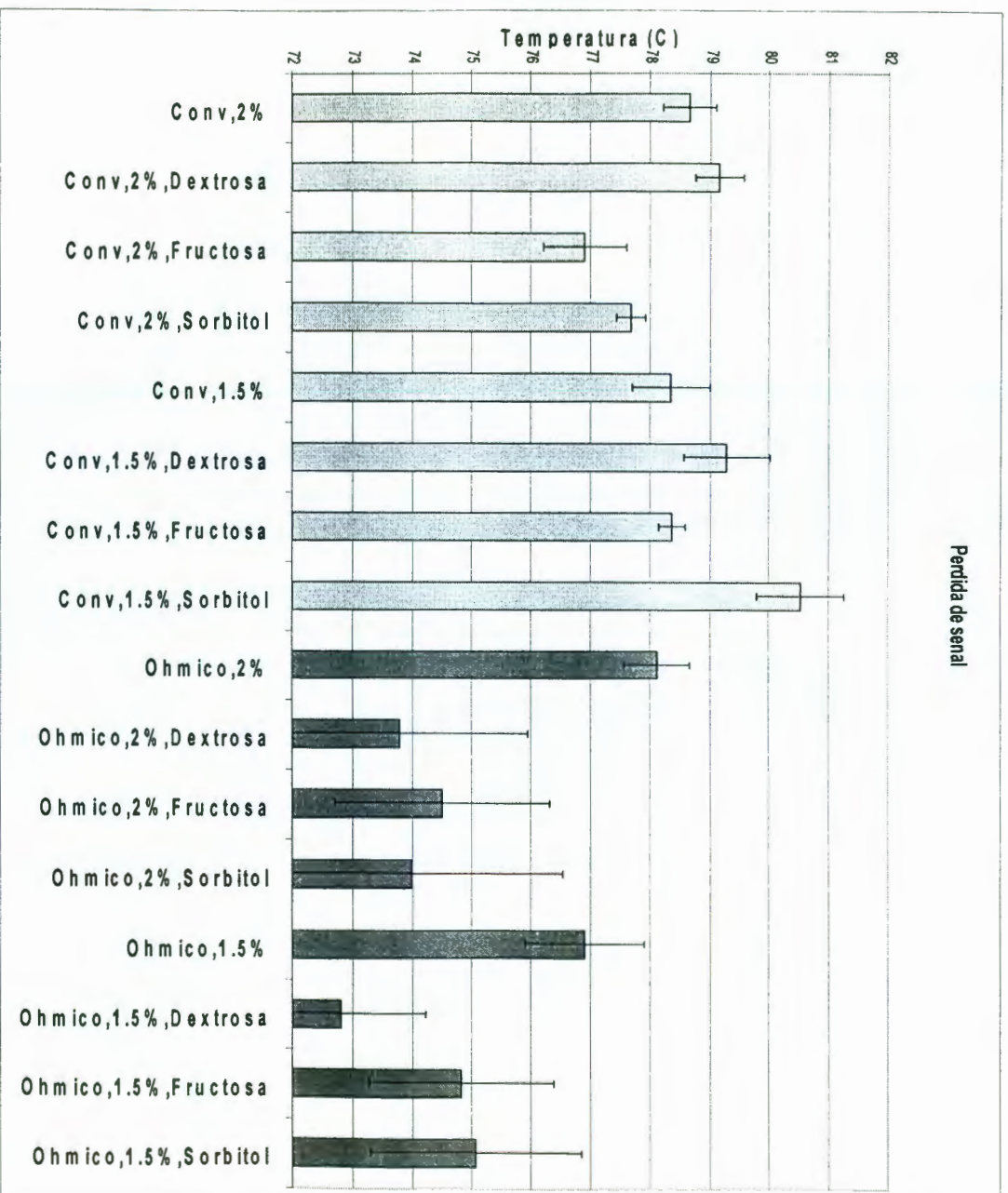


Figura 22 Comparación de la pérdida de señal ocurrido en las soluciones donde se compararon ambos tratamientos.

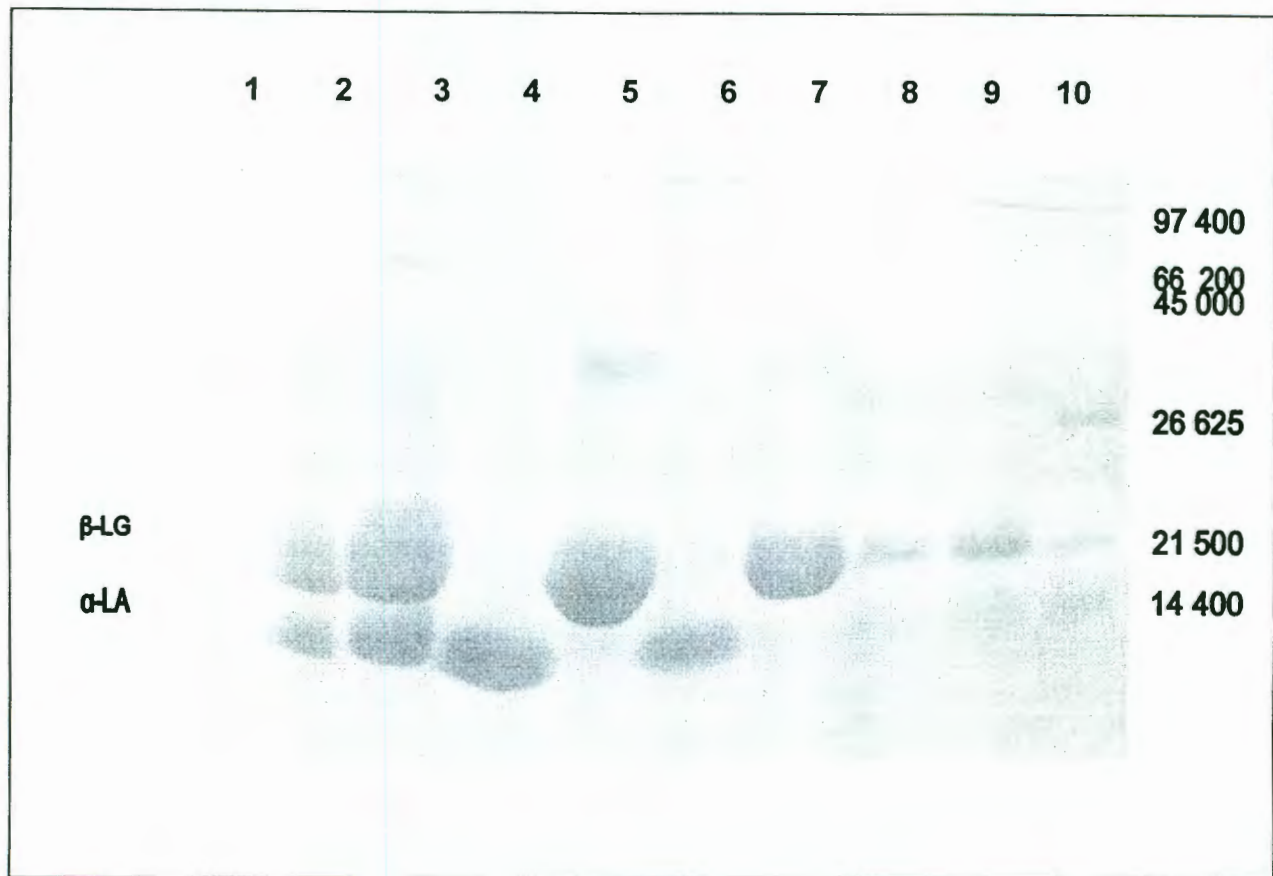


Figura 23. Electroforesis SDS-PAGE con un gel de poliacrilamida 15%T y 3%C en el cual se corrió en el primer carril un marcador de alto peso molecular, en el segundo una muestra de WPI-90 al 2% tratado convectivamente, en el 3 WPI-90 al 2% tratado óhmicamente, en el 4  $\alpha$ -LA-90, en el 5  $\beta$ -LG-90, en el 6  $\alpha$ -LA-90 diluida, en el 7  $\beta$ -LG-90 diluida, en el 8 WPI-90 al 2%, en el 9 WPI-90 al 1.5%, por último un marcador de bajo peso molecular.



Se ha publicado que los complejos SDS-Proteína difieren solo del peso molecular aparente, ya que todos adquieren la misma carga masa (Christer y Lars, 1989). Es por eso que se puede decir que no existe diferencia en el peso molecular de los complejos, pero no se sabe con certeza que la conformación de estos complejos sea diferente, es por eso que pueden utilizarse otras técnicas para evaluarlo.

### VI.3 Granulometría

Al no encontrar diferencias significativas al comparar ambos tratamientos por métodos electroforeticos se opto por otras técnicas para confirmar si en verdad existen estas diferencias, la técnica usada para evaluar la existencia de estas diferencias fue la de granulometría, ya que esta puede distinguir entre el tamaño de partícula del complejo formado en cada tratamiento. Como se presenta en la (Figura 24).

A diferencia de la electroforesis, en la prueba de granulometría se observaron diferencias entre ambos tratamientos, las líneas  $\Delta$  mostradas en la figura, muestran el tamaño de partícula de el complejo formado durante el tratamiento convectivo, el cual tiene una media de .6 micras, que es mucho menor al de las curvas que representan al tratamiento óhmico (representado por  $\bullet$  en la figura 24) y las cuales tienen una media de 0.8 micras y además tiene otro grupo de partículas, las cuales se encuentran en menor proporcion Figura 24  $\bullet$  pero tienen un tamaño de 4 micras, sin embargo no se sabe con certeza si este grupo de partículas realmente son parte del complejo, un complejo diferente o simplemente proteínas aglomeradas que se pegan a la pared del recipiente.

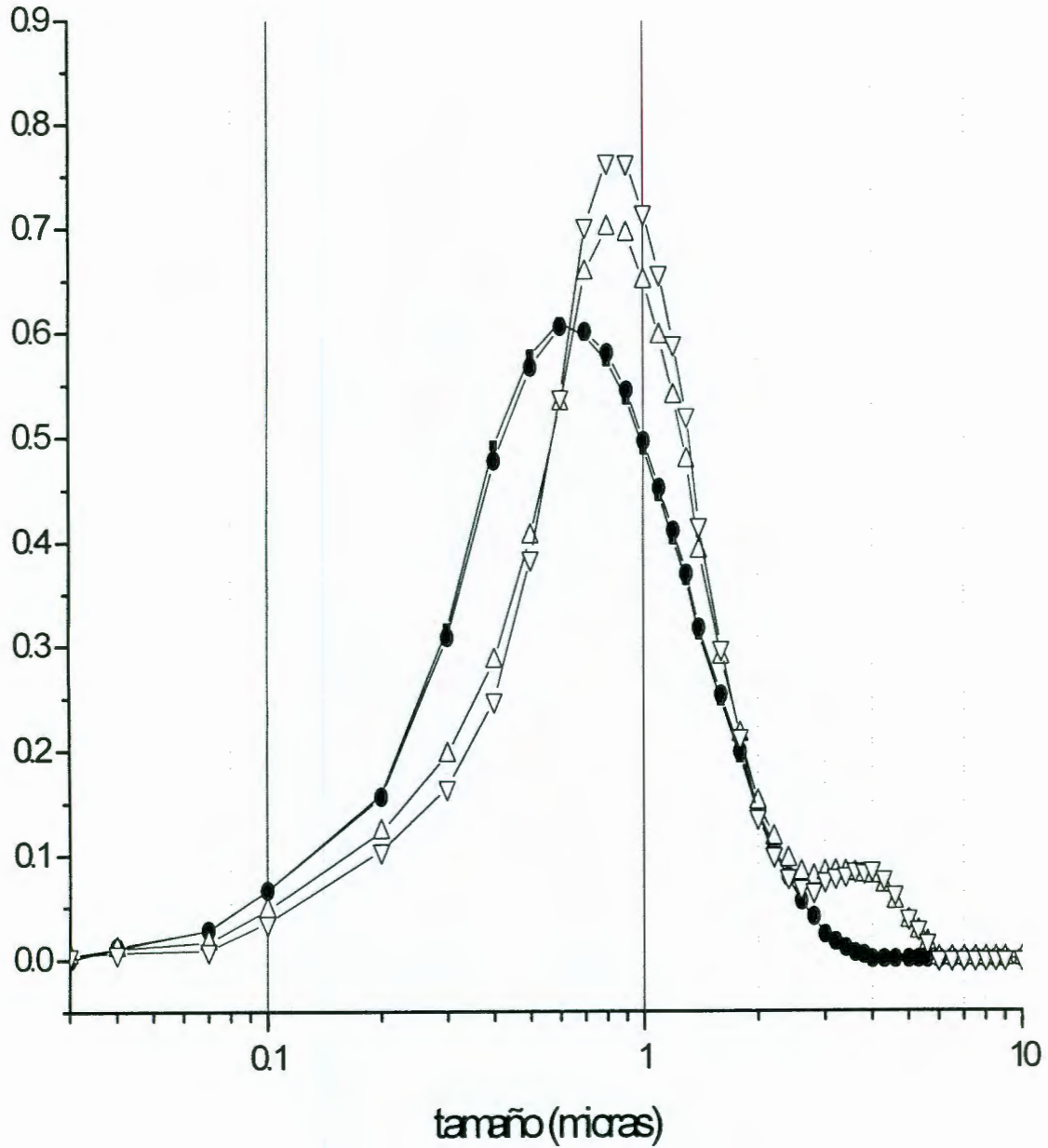


Figura 24 Grafica normalizada de tamaño de partícula Δ = Óhmico • = Convectivo

## VII. CONCLUSIONES

Se estudio el efecto del calentamiento óhmico en proteínas de suero lácteo y se observo, que este calentamiento produce efectos muy diferentes en las proteínas.

Se implemento un equipo de calentamiento óhmico, que puede ser usado como un método alternativo para el calentamiento de alimentos.

Se caracterizo la desnaturalización de las proteínas de suero lácteo utilizando el nuevo método de rotación óptica y se comparo con otro conocido como es el de DSC.

Se estudiaron los efectos de agregar dextrosa fructosa y sorbitol al APS en solución, se observo que cada uno de ellos produce un efecto diferente al ser calentado junto con la proteína.

Se observo por medio de un estudio de granulometría y electroforesis que los complejos formados por calentamiento óhmico y convectivo difieren en tamaño de partícula pero que ambos poseen el mismo peso molecular aparente.



## VIII. BIBLIOGRAFÍA

**Ayadi, M.A., Bouvier, L., Chopard, F. M., Berthou y Leuliet, J.C. 2004.** Heat Treatment Improvement of Dairy Products via Ohmic Heating Processes :Thermal and Hydrodynamic Effect on Fouling. ECI Conference on Heat Exchanger Fouling and Cleaning: Fundamentals and Applications, Santa Fe, New Mexico, USA.

**Barron, L.D. 2004.** Molecular Light Scattering and Optical Activity. 1.ed., Cambridge University Press, London:381-390

**Blakley, R. L. 1981.** "The metabolism and antiketogenic effects of sorbitol. Sorbitol dehydrogenase." *Biochemical Journal*(49): 257-271.

**Bollag, D.M, Rozycki, M.D. y Edelstwin, S.J. 1992.** Protein Methods. 2a.ed., Wiley, New York:

**Boye, J., Ching, M. y Ashraf, I. 2004.** "Thermal stability of  $\beta$ -lactoglobulins A and B: effect of SDS, urea, cysteine and N-ethylmaleimide." *Journal of Dairy Research* 71: 207-214.

**Brown, E. 1945.** Optical instruments. 9a.ed., Chemical publishing co, New York:327-329

**Bylund, G. 1995.** Dairy processing handbook. 1.ed., Tetra Pak, Lund:123-132

**Cairolì, S., Iametti, S. y Bobomi, F. 1994.** "Reversible and irreversible modifications of  $\beta$ -lactoglobulin upon exposure to heat." *Journal of Protein Chemistry* 13: 347-354.

**Campbell, M. K. y Farbell, S. O. 2003.** Bioquímica. 4.ed., Thompson, Cd. Mexico:298-325

**Castro, I., Macedo, B, Texeira, J.A. y Vicente, A.A. 2004.** "The Effect of Electric Field on Important Food-processing Enzymes: Comparison of Inactivation Kinetics under Conventional and Ohmic Heating." *Journal of Food Science* 69: 696-701.

**Chambach, A y Rodbard, D 1971.** "Polyacrylamide gel electrophoresis." *Science* 171: 440-451.

**Christer, J. y Lars, J. 1989.** *Protein Purification*. 1.ed., Riden:349-373

**Collett, E. 1993.** *Polarized light fundamentals and applications*. Dekker, New York:221-236

**De Wit, J.N. 1981.** "Structure and functional behaviour of whey proteins." *Neth Milk Dairy* 35: 47-64.

**De Wit, J.N. y Klarenbeek, G. 1984.** "Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins." *Journal of Food Science* 53: 258-263.

**Dean, J. A. 1995.** *The Analytical Chemistry Handbook*. McGraw Hill, New York:15.1-15.5

**Douglas, D., Vinitha, S. y Sophie, F. 1997.** "Interactions between  $\alpha$ -Lactoalbumin and  $\beta$ -Lactoglobulin in Early Stages of Heat Denaturation." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 3459-3464.

**Fennema, O. 1965.** *Food Chemistry*. 2.ed., Marcel Dekker, New York:796

**Fox, P. F. 2000.** "Milk proteins as food ingredients." *International Journal of Dairy Technology* 54(2): 41-55.

**Garrett, J. M., Stairs, R. A. y Annett, R. G. 1988.** "Thermal Denaturation and Coagulation of Whey Proteins: Effect of Sugars." *Journal of Dairy Science* 71: 10

**Gordon, W.G. y Kalan, E.B. 1974.** Fundamentals of Dairy Chemistry. AVI Publishing, Westport, Ct:87-124

**Gutierrez, A. J. (1995).** partition du carbone et métabolisme du sorbitol dans les feuilles adultes de pêcher. France, Université de Poitiers: 97-99.

**Hambling, S. G., McAlpine, A.S. y Sawyer, L. 1992.** Advanced Dairy Chemistry. 2.ed., Elsevier, New York:141–190

**Hambling, S.G., McAlpine, A.S. y Sawyer, L. 1992.** Advanced Dairy Chemistry, Vol.1. 1.ed., Elsevier, London:102-109

**Harwalkar, V.R. 1979.** "Measurement of Thermal Denaturation of  $\beta$ -Lactoglobulin at pH 2.5." Journal of Dairy Science 63: 1043-1051.

**Hinds Instruments, Inc.** Hillsboro, Oregon, USA PEM-90 Photoelastic modulators <http://www.hindspem.com/lit/pdf/hindpem90.pdf>.

**Hoffman, M. y Van Mil, P. 1999.** "Heat-Induced Aggregation of Lactoglobulin as Function of pH." Journal of Agricultural and Food Chemistry 47: 1898-1905.

**Hollar, C.M. y Parris, H. 1995.** "Factors Affecting the Denaturation and Aggregation of Whey Proteins in Heated Whey Protein Concentrate Mixtures." Journal of Dairy Science 78: 261-267.

**Holt, C. 1999.** "Molecular basis for the aggregation, denaturation, gelation and surface activity of whey proteins: new formulations." International Journal of Food Science and Technology 34: 407-408.

**Jirgenson, B. y Straumanis, M.E. 1962.** A short textbook of colloid chemistry. 2.ed., Bibl, New York:42-64



**Kella, N.K.D. y Kinsella, J.E. 1988.** "Structural stability of  $\beta$ -lactoglobulin in the presence of kosmotropic salts, a kinetic and thermodynamic study." *Journal of Dairy Science* 40: 396-405.

**Kilara, A y Harwalkar, V.R. 1996.** *Food Proteins. Properties and Characterization.* 1.ed., Nakai, S, New York:71-166

**Kongraksawech, T., Vazquez-Landaverde, P., Huerta-Ruelas, J. y Torrez, J.A. 2007.** " Ionic Strength pH effects on optical thermographs for bovine serum albumin (BSA)." *Ciencia y Tecnologia de Alimentos* 5(4): 259-264.

**Kulmyrzaev, A., Bryant, C. y McClements, J. D. 2000.** "Influence of Sucrose on the Thermal Denaturation, Gelation, and Emulsion Stabilization of Whey Proteins." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1593-1597.

**Law, A. y Leaver, J. 2000.** "Effect of pH on the Thermal Denaturation of Whey Proteins in Milk." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 672-679.

**Lebovka, N.I., Shynkaryk, M.V. y Vorobiev, E. 2006.** "Drying of Potatoe Tissue Pretreated by Ohmic Heating." *Drying Technology* 24: 601-608.

**Lima, M., Heskitt, B.F., Burianek, LL. y Sastry, S.K. 1999.** "Ascorbic acid degradation kinetics during conventional and ohmic heating." *Journal of Food Processing Preservation* 23: 421-434.

**Lodish, H., Berk, A. y Matsudaria, P. 2004.** *Molecular Cell Biology.* 5a.ed., WH Freeman, New York:66-71

**Lucena, M. E., Alvarez, S., Mendez, C., Riera, F. y Alvarez, R. 2007.** " $\alpha$ -Lactalbumin precipitation from commercial whey protein concentrates." *Separation and Purification Technology* 52: 446-453.

**Matsudomi, N., Oshita, T., Sasaki, E. y Kobayashi, K. 1993.** " $\alpha$ -Lactalbumin enhances the gelation properties of bovine serum albumin." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 1053-1057.

**Mendoza, P., Lopez, D., Kongraksawech, t., Vazquez, P., Torres, A., Ramirez, A. y Huerta-Ruelas, J. 2005.** "Laser metrology in food related systems." *Proceedings of SPIE(5776)*: 348-355.

**Oldfield, D. J. , Harjinder, S. y Taylor, M. W. 2005.** "Kinetics of heat-induced whey protein denaturation and aggregation in skim milks with adjusted whey protein concentration." *Journal of Dairy Research* 72: 369-378.

**Prabakaran, S., Wilde, P. , Husband, F. y Clark, D. 1997.** "Functional and structural properties of  $\beta$ -lactoglobulin as affected by high pressure treatment." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 4303-4308.

**Rao, M.A. y Anantheswaran, R.C. 1988.** "Convective heat transfer in cans." *Advances in Food Reserch(32)*: 39-84.

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

**Salengke, S. y Sastry, S.K. 2007.** "Experimental investigation of ohmic heating of solid-liquid mixtures under worst-case heating scenarios." *Journal of food Engineering* 83: 324-336.

**Skoog, D. A , Holler, J. y Nieman, T. 1998.** *Principles of Instrumental Analysis*. 5.ed., New York:905-908

**Smits, P. y Van Brouwershaven, J. H. 1980.** "Heat-induced association of  $\beta$ -lactoglobulin and casein micelles." *Journal of Dairy Research* 47: 313-325.

**Townend, R., Herskovits, T.T., Timasheff, S.N. y Gorbunoff, M.J. 1969.** "The state of amino acid residues in  $\beta$ -lactoglobulin." Archives of Biochemistry and Biophysics(129): 567-580.

**Vázquez, P. A. 2002.** Efecto de la ultrafiltración a nivel piloto sobre las proteínas del suero lácteo, Universidad Autónoma de Querétaro.

**Vázquez, P. A., Morales, E. y Huerta-Ruelas, J. 2007.** "Optical techniques coupled to ohmic heating to study heat-induced changes in biological systems." Proceedings of SPIE(6422): 64220f.

**Wehbi, Z., Perez, M. D., Sanchez, L., Pocovi, C. , Barbana, C. y Calvo, M. 2005.** "Effect of Heat Treatment on Denaturation of Bovine  $\alpha$ -Lactalbumin: Determination of Kinetic and Thermodynamic Parameters." Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 9730-9736.

**Welti, C., Gomez, P. , Vergara, B. y Maris, A. 2005.** "Engineering and transport phenomena applications to convective heat transfer study for canned foods." Revista Mexicana de Ingenieria Quimica 5: 89-106.

**Yada, R.Y. 2004.** Proteins in food Processing. Woodhead Publishing, 83-86

**Zhang, G., Foegeding, E. A. y Hardin, C. C. 2004.** "Effect of Sulfated Polysaccharides on Heat-Induced Structural Changes in  $\beta$ -Lactoglobulin." Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 3975-3981.