



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y
FARMACÉUTICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Tesis de Doctorado

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES
ESTRUCTURALES, FUNCIONALES Y
BIOLÓGICAS DE PROTEÍNAS LÁCTEAS
MODIFICADAS ENZIMÁTICAMENTE

Presentada por Manuel A. Mancilla Canales

Rosario, Argentina
2015

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ESTRUCTURALES, FUNCIONALES Y BIOLÓGICAS DE PROTEÍNAS LÁCTEAS MODIFICADAS ENZIMÁTICAMENTE

Manuel A. Mancilla Canales
Licenciado en Biotecnología
Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Área Fisicoquímica, Departamento Química-Física dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2009 y el 12 de febrero de 2015, bajo la dirección de la Dra. Patricia H. Risso y la codirección de la Dra. Estela M. Álvarez.

Nombres y firmas del Director y de los integrantes del Jurado de Tesis:

Director: Dra. Patricia H. Risso

Jurado:

Jurado:

Jurado:

Defendida:

Esta tesis fue realizada con el aporte de los siguientes subsidios:

- Innovación de la elaboración de productos lácteos utilizando endopeptidasas de origen microbiano durante la coagulación enzimática. Programa de Cooperación Científico-Tecnológico entre el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (MINCYT) y la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) de la República Federativa de Brasil – Convocatoria 2011, Modalidad Grupos de Investigación Asociados en Red (2012 - 2014).
- Hidrólisis enzimática de proteínas alimentarias con endopeptidasas de origen bacteriano. Proyectos de Investigación UNR - Convocatoria 2011 (2011-2014).
- Optimización de la gelación ácida y/o enzimática de proteínas lácteas de origen bovino en presencia de ión calcio y azúcares. Influencia del valor agregado en la textura del producto final. COFECYT, MINCYT. Proyectos Federales de Innovación Productiva (PFIP 2007) - Convocatoria 2007 (2009-2012).
- Modificación enzimática de proteínas de leche bovina y ovina: propiedades estructurales funcionales y biológicas. Programa de Cooperación Científico-Tecnológico entre el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (MINCYT) y la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) de la República Federativa de Brasil - Convocatoria 2008 (2009-2011).

Parte de los resultados presentados en esta tesis fueron publicados en:

Capítulos de Libros

1. Hidalgo, María Eugenia; Mancilla Canales, Manuel A.; Nespolo. Cássia R.; Reggiardo, Anselmo D.; Alvarez, Estela M.; Wagner, Jorge R. y Risso Patricia H. *Comparative study of bovine and ovine caseinate aggregation processes: Calcium-induced aggregation and acid aggregation*. Capítulo 9 del Libro: Protein Aggregation, Series: Protein Science and Engineering Microbiology Research Advances, pp. 199-222, 2011. Ed. Douglas A. Stein. Nova Publishers, Hauppauge, New York, USA. ISBN: 978-1-61761-815-4.

Artículos publicados en Revistas Nacionales y Extranjeras con referato

1. Hidalgo, María Eugenia; Folmer Côrrea, Ana Paula; Mancilla Canales, Manuel; Daroit, Daniel Joner; Brandelli, Adriano y Risso, Patricia. *Biological and physicochemical properties of bovine sodium caseinate hydrolysates obtained by a bacterial protease preparation*. Food Hydrocolloids 43, 510-520 (2015).
2. Ingrassia, Romina; Costa, Juan P.; Hidalgo, María E.; Mancilla Canales, Manuel; Castellini, Horacio; Riquelme, Bibiana y Risso, Patricia. *Application of a digital image procedure to evaluate microstructure of caseinate and soy protein acid gels*. LWT - Food Science and Technology 52, 120-127 (2013).
3. Daroit, Daniel Joner*; Folmer Corrêa, Ana Paula*; Mancilla Canales, Manuel*; Gonzalez Coelho, Julise; Hidalgo, María Eugenia; Tichota, Deise Michele; Risso, Patricia Hilda y Brandelli, Adriano. *Physicochemical properties and biological activities of ovine caseinate hydrolysates*. Dairy Science and Technology 92, (4), 335-351 (2012). * Igual contribución

4. Mancilla Canales, Manuel; Hidalgo, María Eugenia; Risso, Patricia y Alvarez, Estela. *Colloidal stability of bovine calcium caseinate suspensions. Effect of protein concentration and presence of sucrose and lactose*. Journal of Chemical and Engineering Data, ACS Publishers 55, 2550-2557 (2010).
5. Nespolo, Cássia R.; Reggiardo, Anselmo D.; Mancilla Canales, Manuel A.; Wagner, Jorge R.; Alvarez, Estela M.; Brandelli, Adriano y Risso, Patricia H. *Effect of calcium on ovine caseinate functional properties*. Journal of Chemical and Engineering Data, ACS Publishers 55, 4624-4631 (2010).
6. Mancilla Canales, Manuel; Alvarez, Estela Mari. *Colloidal stability of caseinate from bovine source. A contribution to nutritional enrichment of massive consumption foods*. Revista Online e-Universitas UNR Journal 2, 359-360, (2009), <http://www.e-universitas.edu.ar>

Artículos Inéditos

1. Mancilla Canales, Manuel; Apesteguía, Ana; Fonseca, Renata; Brandelli, Adriano; Riquelme, Bibiana y Risso, Patricia. *Enzymatic Coagulation of Bovine Casein Micelles Induced by Bacterial Endopeptidases*.
En proceso de redacción.

Trabajos Completos (Proceedings) presentados en Reuniones Científicas

Publicados en Actas de Reuniones Científicas Internacionales:

1. Apesteguía, A; Mancilla Canales, M; Quiroga, M.; Daroit, D.; Brandelli, A. y Risso, P. *Estudio de la coagulación enzimática de micelas de caseína bovina inducida por endopeptidasas segregadas por Bacillus sp.* P45. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICYTAC2012). Córdoba, 2012.
2. Corrêa, A. P.; Hidalgo, M. E.; Mancilla Canales, M.; Risso, P. y Brandelli, A. *Hidrolizados de caseinato bovino bioactivos obtenidos por acción de una enzima extracelular producida por Bacillus sp.* P7. Actas VI Jornadas Internacionales de Proteínas y Coloides Alimentarios (JIPCA VI). Buenos Aires, 2011.
3. Reggiardo, Anselmo; Nespolo, Cássia; Mancilla Canales, Manuel; Alvarez, Estela y Risso, Patricia. *Evaluation of ovine sodium caseinate functional properties in the presence of calcium.* Actas Congreso Mundial y Exposición Ingeniería 2010. Capítulo “Innovación en la producción primaria e industrias agroalimentarias: IPPIA”. Unión Argentina de Asociaciones de Ingenieros (UADI) y Centro Argentino de Ingenieros (CAI). Buenos Aires, 2010.

Publicados en Actas de Reuniones Científicas Nacionales:

1. Apesteguía, Ana; Fonseca, Renata; Mancilla Canales, Manuel y Risso, Patricia. *Coagulación enzimática de leche bovina por acción de endopeptidasas de origen bacteriano.* Actas XIV Congreso y XXXII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Casilda, 2012. Premio "Sociedad de Biología de Rosario" al mejor trabajo de investigación en el Área Agropecuaria, 2012.

2. Mancilla Canales, Manuel; Apesteguía, Ana; Quiroga, Marisa; Corrêa Folmer, Ana P.; Brandelli, Adriano y Risso, Patricia. *Factores que afectan la coagulación de micelas de caseína bovina inducida por una enzima de origen bacteriano*. Actas del II Simposio Argentino de Lactología (IISAL). Santa Fe, 2012.
3. Ingrassia, R; Costa, JP; Hidalgo, María E; Mancilla Canales, M; Castellini H y Riquelme, B. *Evaluación de la microestructura de geles proteicos por análisis textural de imágenes digitales*. Actas XIII Congreso y XXXI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 2011. Premio "Sociedad de Biología de Rosario" al segundo mejor trabajo de investigación en el Área Agropecuaria, 2011.

Comunicaciones presentadas en Reuniones Científicas

Publicadas en Actas de Reuniones Científicas Internacionales:

1. Mancilla Canales, M; Fontoura, R; Folmer Côrrea, AP; Daroit, D; Brandelli, A y Risso, P. *Capacidad antioxidante de sueros lácteos obtenidos a partir de la coagulación de micelas de caseína inducida por proteasas bacterianas*. V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICyTAC 2014). Córdoba, 2014.
2. Hidalgo, ME; Folmer Côrrea, AP; Mancilla Canales, M; Daroit, D; Brandelli, A y Risso, P. *Propiedades reológicas y de microestructura de geles ácidos de caseinato de sodio con hidrolizados bioactivos*. V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICyTAC 2014). Córdoba, 2014.

3. Hidalgo, María Eugenia; Folmer Côrrea, Ana Paula; Mancilla Canales, Manuel; Daroit, Daniel Joner; Brandelli, Adriano y Risso, Patricia. *Obtención e identificación de péptidos bioactivos de caseinato de sodio bovino*. International Conference in Food Innovation Food Innova. Concordia, Entre Ríos, 2014
4. Folmer Correa, Ana Paula; Brandelli, Adriano; Daroit, Daniel; Mancilla Canales, Manuel y Risso, Patricia. *Evaluation of hydrolysates obtained from ovine caseinate by a bacterial enzyme*. XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (XXII CBCTA). Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Salvador, Bahía, Brasil, 2010.
5. Fortuna, N.; Reggiardo, A.; Nespolo, C.; Mancilla Canales, M.; Alvarez, E. *Estudio comparativo de la estabilidad coloidal de agregados de caseinato de calcio de origen ovino y bovino*. III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba 2009 (CICyTAC 2009), Córdoba, 2009.

Publicadas en Actas de Reuniones Científicas Nacionales:

1. Mancilla Canales, M.; Apesteguía, A; Fonseca, R; Brandelli, A; Folmer Corrêa, AP; Risso, P y Riquelme, B. *Modelización fisicomatemática de la interacción entre micelas de caseína y enzimas bacterianas*. 99a Reunión Nacional de la Asociación Física Argentina. Tandil, Bs. As., 2014.
2. Apesteguía, Ana; Dos Santos Da Fonseca, Renata; Quiroga, Marisa; Mancilla Canales, Manuel y Risso, Patricia. *Efecto de diferentes cosolutos sobre la coagulación de micelas de caseína promovida por enzimas bacterianas*. XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XIV CYTAL). Rosario, 2013.

3. Apesteguía, Ana; Dos Santos Da Fonseca, Renata; Quiroga, Marisa; Mancilla Canales, Manuel y Risso, Patricia. *Efecto de diferentes cosolutos sobre la coagulación de micelas de caseína promovida por enzimas bacterianas*. XVIII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química. Rosario, 2013.
4. Hidalgo, María E.; Corrêa, Ana P. F.; Mancilla Canales, Manuel; Daroit, Daniel J.; Brandelli, Adriano y Risso, Patricia H. *Estudio comparativo de las capacidades antioxidante y de agregación de hidrolizados de caseinatos de origen bovino y ovino*. Actas II Simposio Argentino de Lactología (IISAL). Santa Fe, 2012.
5. Mancilla Canales, Manuel; Daroit, Daniel Joner; Folmer Corrêa, Ana Paula; Alvarez, Estela Mari; Brandelli, Adriano; Risso, Patricia. *Obtención y evaluación de hidrolizados de caseinato de sodio bovino por acción enzimática de proteasas de origen bacteriano*. Actas 1° Simposio Argentino de los Procesos Biotecnológicos (SAPROBIO 2010). Rosario, 2010.

Cursos de Perfeccionamiento Científico (Cursos de Postgrado) realizados durante el Doctorado

1. “Cinética enzimática”, Rosario, 2012. Aprobado: 9 (nueve). Escuela de Graduados, FCBF, UNR. 60 hs.
2. “Relación estructura función en proteínas”, Rosario, 2011. Aprobado: 8 (ocho). Escuela de Graduados, FCBF, UNR. 60 hs.
3. “Tópicos de Biofisicoquímica”, Rosario, 2011. Aprobado: 10 (diez). Escuela de Graduados, FCBF, UNR. 60 hs.
4. “Espectroscopia de biomoléculas”, Rosario, 2011. Aprobado: 6 (seis). Escuela de Graduados, FCBF, UNR. 78 hs.

5. “Epistemología”, Rosario, 2010. Aprobado: 9,5 (nueve coma cinco). Escuela de Graduados, FCBF, UNR. 30 hs.
6. “Avances en emulsiones alimentarias”, Bernal, 2010. Aprobado: 7 (siete). Secretaría de Posgrado, Universidad Nacional de Quilmes. 40 hs.
7. “Análisis Digital de Imágenes”, Rosario, 2010. Aprobado: 10 (diez). Escuela de Graduados, FCBF, UNR. 40 hs.
8. “Estadística aplicada”, Rosario, 2009. Aprobado: 10 (diez). Escuela de Graduados, FCBF, UNR. 72 hs.

Totalidad de horas cursadas y aprobadas: 440 horas

Totalidad de horas obligatorias para el Doctorado: 300 horas

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de esta tesis doctoral hubiese sido imposible sin la participación de personas e instituciones que han facilitado las cosas para que este trabajo llegue a un feliz término. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para ser justo y consecuente con ellas, expresándoles mis agradecimientos.

En primer lugar a mis padres, Esther y Francisco, quienes han sido un apoyo moral y económico para lograr éste fin. Gracias por su paciencia!

A mi directora de tesis y una de las personas que más admiro por su inteligencia y sus conocimientos, la Prof. Dra. Patricia H. Risso, a quien le debo el hecho de que ésta tesis tenga lo menos errores posibles. Gracias por ser tan estricta!

Para con mi codirectora, la Prof. Dra. Estela M. Alvarez tengo sólo palabras de agradecimiento. A ella le debo mis primeras incursiones en el mundo de la investigación.

Debo agradecer de manera especial y sincera a la Dra. Bibiana Riquelme porque su paciencia, apoyo y confianza en mi trabajo ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador.

A la Prof. Mirta Armendariz, por compartir su conocimiento, por su disponibilidad y por su generosidad.

A mis compañeros del grupo de investigación: Maru, Romi, Milly, Mica, Juli, Debo y Ani.

A mis compañeros docentes: Ana, Marta, Gabriel, Lucía y Maela.

A mis hermanas y amigos por ayudarme y apoyarme sin condiciones. Gracias por facilitarme las cosas!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	VII
LENGUAJE ESPECIAL	X
RESUMEN	XI
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Importancia del tema	1
1.2. La leche	1
1.3. Composición de la leche	2
1.4. Componentes de la leche	2
1.4.1. Carbohidratos	2
1.4.2. Lípidos	3
1.4.3. Proteínas	3
1.4.3.1. Proteínas del suero	3
1.4.3.2. Caseínas (CN)	4
1.4.3.3. Micelas de caseína (MC)	6
1.4.3.4. Comparación entre las CN y WP	8
1.4.3.5. Propiedades moleculares de las WP y de las CN	9
1.4.3.6. Comparación interespecie	10
1.4.4. Otros componentes	11
1.4.4.1. Sales	11
1.5. Sistemas modelos de alimentos	11
1.5.1. Propiedades funcionales de las proteínas	12
1.6. Geles de proteínas lácteas	12
1.6.1. Geles de CN	13
1.6.2. Geles de WP	14
1.6.2.1. Gelación fría	14
1.7. Componentes bioactivos en la leche y en productos lácteos	14
1.7.1. Rol del calcio	15
1.7.2. Péptidos encriptados biológicamente activos	15

1.7.3. Obtención de los péptidos con potencial actividad biológica	15
OBJETIVOS	17
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1. MATERIALES	18
2.1.1. Reactivos químicos utilizados	18
2.1.2. Preparación de soluciones	19
2.1.2.1. Soluciones de caseinato de sodio	19
2.1.2.2. Preparación de las micelas de caseína (MC)	19
2.1.2.3. Soluciones de ANS	19
2.1.2.4. Soluciones reguladoras	20
2.1.2.5. Preparación de muestras, soluciones y geles para electroforesis	20
2.1.2.5.1. SDS-PAGE	20
2.1.2.5.2. Tricina-SDS-PAGE	21
2.1.3. Equipos utilizados	21
2.1.3.1. Mediciones espectroscópicas	21
2.1.3.2. Mediciones potenciométricas	22
2.1.3.3. Mediciones reológicas	22
2.1.3.4. Microscopía	22
2.1.3.4.1. Microscopio óptico	22
2.1.3.4.2. Microscopio confocal	23
2.1.3.5. Equipos de apoyo	23
2.1.4. Programas de procesamiento de datos utilizados	23
2.2. MÉTODOS	24
2.2.1. Determinación de proteínas por el método de Lowry	24
2.2.2. Determinación de la concentración de caseína utilizando el método de Kuaye	25
2.2.3. Evaluación del tamaño medio de las partículas de NaCAS por medidas de τ	25
2.2.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida	28

2.2.5. Determinación de la Estabilidad Coloidal	29
2.2.6. Mediciones viscosimétricas de los ACC	31
2.2.6.1 Determinación de la viscosidad relativa	31
2.2.6.2 Determinación de la viscosidad intrínseca	33
2.2.6.3 Determinación del volumen específico parcial y del factor de forma	33
2.2.7. Estudio espectrofluorimétrico	34
2.2.7.1. Estudio de los cambios estructurales del NaCAS	34
2.2.7.2. Determinación de la hidrofobicidad superficial (S_H)	35
2.2.8. Estudio de la agregación de las partículas de NaCAS o WPI por acidificación inducida por GDL	35
2.2.9. Evaluación de la gelación ácida de NaCAS bovino	37
2.2.9.1. Determinación de las propiedades reológicas	37
2.2.9.2. Obtención de las imágenes de los geles ácidos formados	38
2.2.9.3. Determinación del diámetro medio de los intersticios de geles ácidos	39
2.2.10. Análisis textural de imágenes	39
2.2.11. Obtención de los <i>pooles</i> enzimáticos P7 y P45	41
2.2.12. Determinación de la actividad enzimática de PEP7 y PEP45	41
2.2.13. Determinación de la actividad coagulante de PEP7 y PEP45	42
2.2.14. Obtención de los hidrolizados proteicos de NaCAS y WPI	42
2.2.15. Grado de hidrólisis	43
2.2.16. Espectrometría de masa	43
2.2.17. Ensayos de bioactividad de los hidrolizados obtenidos	43
2.2.17.1. Evaluación de la capacidad antioxidante	43
2.2.17.1.1. Determinación de la actividad secuestradora de radical $ABTS^{\cdot+}$	43
2.2.17.1.2. Ensayo de actividad secuestradora de radical $DPPH^{\cdot}$	44
2.2.17.1.3. Determinación de actividad quelante de metal	45
2.2.17.1.4. Determinación del poder reductor	45
2.2.17.2. Determinación de actividad antibacteriana	46
2.2.17.3. Determinación de actividad antifúngica	47
2.2.18. Análisis estadístico	47

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
3.1. Evaluación del estado inicial del NaCAS bovino y ovino previo a la hidrólisis	48
3.1.1. Efecto de la presencia de iones calcio	48
3.1.1.1. Estabilidad coloidal (Solubilidad)	48
3.1.1.2. Composición proteica	53
3.1.1.3. Cambios en el tamaño medio de los ACC	55
3.1.1.4. Viscosidad intrínseca y el volumen específico parcial	59
3.1.1.5. Conformación proteica evaluada mediante espectrofluorimetría	60
3.1.1.6. Modelo para el sistema CAS/Ca ²⁺	62
3.2. Proteólisis del NaCAS ovino	65
3.2.1. Estudios de los hidrolizados proteicos de NaCAS ovino obtenidos con PEP7	65
3.2.1.1. Obtención de los hidrolizados	65
3.2.1.2. Evaluación del proceso de agregación ácida de los hidrolizados obtenidos con el PEP7	66
3.2.1.3. Evaluación del proceso de agregación ácida de NaCAS ovino en presencia de sus hidrolizados	66
3.2.1.4. Ensayos de actividades biológicas de los hidrolizados	68
3.2.1.4.1. Ensayo de la capacidad antioxidante	68
3.2.1.4.2. Actividad antimicrobiana	71
3.2.2. Estudios de los hidrolizados proteicos de NaCAS ovino obtenidos con PEP45	74
3.2.2.1. Obtención de los hidrolizados	74
3.2.2.2. Estudio conformacional de los hidrolizados a través de espectros de absorción y de emisión de la fluorescencia intrínseca de los cromóforos proteicos	75
3.2.2.3. Hidrofobicidad superficial	76
3.2.2.4. Evaluación del proceso de agregación ácida de los hidrolizados obtenidos con PEP45	77
3.2.2.5. Evaluación del proceso de agregación ácida de NaCAS ovino en presencia de sus hidrolizados obtenidos con PEP45	78
3.2.2.6. Ensayos de propiedades biológicas de hidrolizados de NaCAS	79

ovino obtenidos con PEP45	
3.2.2.6.1. Ensayo de la capacidad antioxidante	79
3.2.2.6.2. Actividad antimicrobiana	80
3.3. Proteólisis del NaCAS bovino	83
3.3.1. Estudios de los hidrolizados proteicos de NaCAS bovino obtenidos con PEP7	83
3.3.1.1. Obtención de los hidrolizados proteicos	83
3.3.1.2. Estudio conformacional de los hidrolizados a través de espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de los cromóforos proteicos	84
3.3.1.3. Evaluación del proceso de agregación ácida de los hidrolizados obtenidos con PEP7	84
3.3.1.4. Evaluación del proceso de agregación ácida de NaCAS bovino en presencia de sus hidrolizados obtenidos con PEP7	85
3.3.1.5. Efecto de la adición de los hidrolizados sobre las propiedades reológicas de los geles ácidos de NaCAS bovino	86
3.3.1.6. Evaluación de la microestructura de los geles mixtos obtenidos	87
3.3.1.7. Ensayos de actividades biológicas de los hidrolizados de NaCAS bovino obtenidos con PEP7	90
3.3.1.7.1. Ensayo de la capacidad antioxidante	90
3.3.1.7.2. Actividad antimicrobiana	92
3.4. Proteólisis de los WPI	94
3.4.1. Estudios de los hidrolizados proteicos de WPI obtenidos con PEP7	94
3.4.1.1. Obtención de los hidrolizados proteicos	94
3.4.1.2. Estudio conformacional de los hidrolizados a través de espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de los cromóforos proteicos	94
3.4.1.3. Evaluación del proceso de agregación ácida de los hidrolizados obtenidos con PEP7	95
3.4.1.4. Evaluación del proceso de agregación ácida de WPI en presencia de sus hidrolizados obtenidos PEP7	96
3.4.1.5. Ensayos de actividades biológicas de los hidrolizados de WPI obtenidos con PEP7	97
3.4.2. Estudios de los hidrolizados proteicos de WPI obtenidos con PEP45	99
3.4.2.1. Obtención de los hidrolizados proteicos	99

3.4.2.2. Estudio conformacional de los hidrolizados a través de espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de los cromóforos proteicos.	99
3.4.2.3. Evaluación del proceso de agregación ácida de WPI en presencia de sus hidrolizados obtenidos con PEP45	100
3.4.2.4. Ensayos de actividades biológicas de los hidrolizados de WPI obtenidos con PEP45	100
3.4.2.4.1. Ensayo de capacidad antioxidante	100
3.4.2.2.2. Actividad antimicrobiana	102
3.5. Ensayos de coagulación enzimática de MC bovinas por acción de PEP7 y PEP45	102
3.5.1. Capacidad coagulante	102
3.5.2. Evaluación de la microestructura de los geles obtenidos	104
3.5.3. Análisis multirespuesta de los resultados de Diseños de Experimentos	109
3.5.4. Actividad biológica de los sueros obtenidos	109
CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES	111
4.1. Estado inicial de las CN bovinas y ovinas previo a la hidrólisis	111
4.2. Caracterización de los péptidos obtenidos por hidrólisis de NaCAS o WPI y efecto sobre las propiedades esctructurales	112
4.3. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre la capacidad de agregación y/o gelación proteica frente a la acidificación	113
4.4. Bioactividad de los productos de hidrólisis	115
4.5. Efecto de la hidrólisis de las micelas de caseína bovinas por acción enzimática de PEP7 y PEP45	118
4.6. Conclusiones generales. Posibles aportes a la industria alimentaria.	118
CAPÍTULO 5: REFERENCIAS	120

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

$[Ca^{2+}]$	Concentración de calcio libre
$[Ca^{2+}]_T$	Concentración de calcio total
$[\eta]$	Viscosidad intrínseca
α -La	α -Lactoalbúmina
α_s -CN	Caseínas α_{s1} y α_{s2}
α_{s1} -CN	Caseína α_{s1}
α_{s2} -CN	Caseína α_{s2}
β	Parámetro β
β -CN	Caseína β
β -Lg	β -Lactoglobulina
β -ME	β -mercaptoetanol
η	Viscosidad
η_r	Viscosidad relativa
κ -CN	Caseína κ
λ	Longitud de onda
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación
v	Factor de forma
ρ	Densidad
τ	Turbidez
\bar{v}_2	Volumen específico parcial
A	Absorbancia
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzo-tiazolina 6- sulfónico)
ACC	Agregados de caseinato de calcio
ANS	Ácido 8-anilino-1-naftalén sulfónico
bis-acrilamida	N,N'-metilénbisacrilamida
BHI	Infusión cerebro-corazón
C_{CN}	Concentración de caseína
Ca^{2+} :CAS	Concentración de ión calcio: concentración de caseinatos
CAS	Caseinato(s)

CN	Caseína(s)
D_f	Dimensión fractal
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DPPH	2,2- difenil-1-picril-hidrazil
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
G'	Módulo de almacenamiento o Módulo elástico
G'_{max}	Módulo elástico máximo
G''	Módulos de pérdida o Módulos viscoso
G''_{max}	Módulos viscoso máximo
GDL	Glucono- δ -lactona
GH	Grado de hidrólisis
IF	Intensidad relativa de fluorescencia
K_1	Constante aparente de fijación del Ca^{2+} por sitio en el primer equilibrio de precipitación
K'_1	Constante aparente de fijación del Ca^{2+} por sitio en el segundo equilibrio de precipitación
K_2	Constante aparente de fijación del Ca^{2+} por sitio en el equilibrio de redisolución
m	Números de moles de Ca^{2+} unidos a los sitios en el equilibrio de redisolución por mol de proteína
MC	Micelas de caseínas
n	Números de moles de Ca^{2+} unidos a los sitios del primer equilibrio de precipitación por mol de proteína
n'	Números de moles de Ca^{2+} unidos a los sitios del segundo equilibrio de precipitación por mol de proteína
NaCAS	Caseinato de sodio
pH_{ag}	pH de agregación
P_i	Fosfato inorganico
PBS	Buffer fosfato salino
PEP7	Pool enzimático obtenido de <i>Bacillus</i> sp. P7
PEP45	Pool enzimático obtenido de <i>Bacillus</i> sp. P45
R	Relación proteína:glucono- δ -lactona
S	Entropía de Shannon

S_0	Solubilidad intrínseca de la caseína no unida al Ca^{2+}
S_1	Solubilidad intrínseca de la caseína unida al Ca^{2+} en los sitios de fijación n
S'_1	Solubilidad intrínseca de la caseína unida al Ca^{2+} en los sitios de fijación n'
S_2	Solubilidad intrínseca de la caseína unida al Ca^{2+} en los sitios de fijación m
S_{ap}	Solubilidad aparente
S_H	Hidrofobicidad superficial
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
t	Tiempo
t_{ag}	Tiempo de agregación
t_c	Tiempo de coagulación
t_g	Tiempo de gelificación
t_i	Tiempo de incubación de <i>i</i> horas
$\tan \delta$	Tangente de pérdida
tricina-SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y tricina
T	Temperatura
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TNBS	Ácido trinitrobencensulfónico
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Uniformidad
U_{ACM}	Unidad de actividad coagulante de MC.
U_{AE}	Unidad de actividad enzimática
UV	Ultravioleta
V	Visible
WP	Proteínas del suero lácteo o lactosuero
WPC	Concentrado de proteínas del lactosuero
WPI	Aislado de proteínas del lactosuero
Y	Escala de grises

LENGUAJE ESPECIAL

<i>Bit</i>	Unidad mínima de información (Informática)
<i>Buffer</i>	Solución reguladora o tampón
<i>TIFF</i>	Tipo de formato de almacenamiento de imágenes digitales
<i>Píxel</i>	Elemento de imagen
<i>Pool</i>	Conjunto/Mezcla
<i>Salting-in</i>	Proceso de redisolución
<i>Salting-out</i>	Proceso de precipitación
Secado <i>spray</i>	Tipo de secado utilizado en Tecnología de los Alimentos
Solución <i>stock</i>	Solución madre
<i>Zoom</i>	Acercamiento/aumento

RESUMEN

Las caseínas y su correspondiente sal de sodio y calcio son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria debido a sus propiedades fisicoquímicas, nutricionales y funcionales, las cuales las convierten en ingredientes valiosos en formulaciones alimenticias complejas. Por otra parte, el suero lácteo constituye cerca de 85-90% del volumen de leche usado para elaborar quesos, y retiene un 55% de los nutrientes. Las proteínas del lactosuero han llamado la atención por su elevado valor biológico en relación a otras proteínas, y por su elevado contenido en cisteína que auxilia en funciones antioxidantes.

Mediante hidrólisis química o enzimática, las proteínas son escindidas en aminoácidos libres y/o péptidos de diferentes tamaños. La hidrólisis enzimática bajo condiciones moderadas de pH (6-8) y de temperatura (40-60 °C) hace posible el obtener componentes nutricionales bioactivos con propiedades funcionales aumentadas. Esta hidrólisis busca optimizar la estabilidad térmica, disminuir la alergenicidad, producir biopéptidos, modelar la cantidad y tamaño de los péptidos para dietas especiales, y modificar las propiedades funcionales tales como gelación, emulsificación y formación de espumas.

En los últimos años, se ha evidenciado que las proteínas lácteas son fuente de péptidos bioactivos con potencial beneficio para la salud. Estos péptidos están inactivos dentro de la secuencia proteica de origen y pueden ser liberados durante el procesamiento del alimento o digestión gastrointestinal. Una vez liberados, los péptidos poseen diversas actividades biológicas, entre las cuales se destacan actividades regulatorias de los sistemas gastrointestinal, inmune, cardiovascular y nervioso.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar las propiedades estructurales, funcionales y biológicas de hidrolizados de caseínas/caseinatos de origen bovino y ovino y proteínas del suero lácteo bovino obtenidos por hidrólisis enzimática con proteasas de origen bacteriano. Las proteasas, denominadas P7 y P45, consistieron en *pooles* enzimáticos obtenidos a partir de bacterias identificadas filogenéticamente como linajes de *Bacillus* sp. P7 y sp. P45 respectivamente, que habitan en el tracto intestinal del pez *Piaractus mesopotamicus*.

En primer lugar, se caracterizaron las suspensiones acuosas de caseinato de sodio (NaCAS), evaluando la estabilidad coloidal de las mismas en ausencia y en presencia de iones calcio; determinándose la composición proteica, los cambios de tamaño medio y el volumen específico parcial de los agregados coloidales solubles. Además, se estudiaron los cambios

conformacionales de dichos agregados mediante la determinación de la hidrofobicidad superficial y los espectros de fluorescencia de los fluoróforos intrínsecos proteicos.

Comparativamente, se encontró que los agregados ovinos de caseinato de calcio fueron menos estables que los agregados bovinos. La diferencia observada podría deberse a la composición proteica de los agregados y una mayor cantidad de grupos fosfoserinas que actúan como sitios de unión al calcio. Estos estudios permitieron evaluar el estado inicial de las caseínas bovinas y ovinas previo a la hidrólisis enzimática, adquiriendo una mejor comprensión de su comportamiento frente al ión calcio.

En segundo lugar, se obtuvieron los *pooles* enzimáticos a partir del cultivo en medios nutritivos económicos de los *Bacillus* sp. P7 y sp. P45, a los cuales se los denominó PEP7 y PEP45, respectivamente. Se determinó la actividad enzimática de los mismos usando azocaseína como sustrato.

Luego, se realizó la hidrólisis de muestras de NaCAS bovino y ovino y de aislados de proteínas de lactosuero con PEP7 y PEP45, a diferentes tiempos de hidrólisis. Los hidrolizados obtenidos en cada caso fueron caracterizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y estudios espectrofotométricos y espectrofluorimétricos.

Se determinó la actividad antioxidante de los hidrolizados mediante la capacidad de captura del radical ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico ($ABTS^{\cdot+}$), el ensayo de captura del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil ($DPPH^{\cdot}$), la actividad quelante del catión ferroso y del poder reductor. Además, se evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica.

En general, los hidrolizados proteicos evidenciaron actividad antioxidante. Dicha actividad puede proteger a los sistemas biológicos contra el daño vinculado al estrés oxidativo en casos de enfermedad. Estos hidrolizados antioxidantes pueden emplearse para prevenir las reacciones de oxidación, tales como la peroxidación lipídica, que conducen al deterioro de los alimentos. Además, evidenciaron propiedades antimicrobianas contra microorganismos causantes de intoxicaciones alimentarias y del deterioro de los alimentos y que también son patógenos oportunistas, agregando de esta forma calidad y seguridad en los productos alimenticios. Adicionalmente, la inhibición de hongos filamentosos podría representar una aplicación adicional como un nuevo agente antifúngico.

También se estudió la capacidad de estos hidrolizados, obtenidos a distintos tiempos de hidrólisis, y sus mezclas con las proteínas de origen, de agregar y gelificar por disminución controlada del pH inducida por la adición de glucono- δ -lactona (GDL).

A bajas concentraciones proteicas, se examinó la cinética del proceso de agregación ácida y el grado de compactación de los agregados obtenidos. La cinética de la agregación inicial de

las partículas se evaluó por medidas turbidimétricas, interpretando los resultados según deducciones desarrolladas por nuestro grupo de trabajo. Los posibles cambios de tamaño y/o grado de compactación fueron estudiados basándose en la dependencia de la turbidez con la longitud de onda en el rango de 450-650 nm, rango en donde no hay absorción de los grupos cromóforos de la proteína. A partir de estos resultados se pudieron analizar las variaciones en la velocidad inicial del proceso de agregación y del grado de compactación de los agregados formados a la luz de la teoría de los fractales.

La distinta naturaleza en composición, carga, tamaño y proteínas de origen de los péptidos obtenidos por las preparaciones enzimáticas se vieron reflejadas en sus distintos comportamientos para agregar ante la presencia de GDL, observándose, en algunos casos, pérdida de la capacidad de agregación, diferencias en la estabilidad electrostática o en el tiempo para iniciar la coagulación y en el grado de compactación alcanzado.

Estudios de mezclas de los hidrolizados obtenidos con sus proteínas de origen sugieren la posibilidad de inclusión de los hidrolizados en una matriz de la proteína de origen sin alterar significativamente los perfiles de la agregación. Aunque el grado de compactación alcanzado puede relacionarse a las propiedades reológicas, se necesitaría realizar estudios adicionales para evaluar el efecto de la incorporación de los hidrolizados sobre la estructura y textura de los geles ácidos.

A altas concentraciones proteicas, se investigó la variación de las propiedades reológicas durante el proceso de gelación ácida. Estos ensayos fueron realizados bajo cizallamiento para determinar las propiedades viscoelásticas de los sistemas, a bajas deformaciones y para evaluar los sistemas durante la formación de los geles y en el equilibrio. Para ello se utilizó un reómetro de tensión controlada y se estudió la cinética de la gelación, evaluando las variaciones de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') en función del tiempo. También se estudió la microestructura de los geles formados (tamaño medio, distribución de tamaño de poros y parámetros de textura) mediante el análisis de imágenes obtenidas por microscopía convencional y confocal.

Los resultados evidenciaron que no ocurrieron mayores cambios en la cinética del proceso, pero sí en la elasticidad final alcanzada por los geles. La presencia de los hidrolizados condujo a la disminución del carácter elástico de los geles ya que dichos hidrolizados podrían dificultar los reordenamientos entre partículas. Sin embargo, en todos los casos predominó el carácter elástico sobre el viscoso. Adicionalmente, el análisis de la microestructura reveló que a medida que el tiempo de hidrólisis fue mayor, la cantidad de poros se incrementó y los mismos fueron de menor tamaño. De esta forma, la presencia de los hidrolizados en las mezclas

contribuiría a que la estructura ordenada de los geles sea más débil, lo que concuerda con los valores de módulo elástico obtenidos.

Por otra parte, se evaluó la capacidad de PEP7 y PEP45 para coagular la leche bovina. Para ello se evaluó la agregación post enzimática de suspensiones de micelas de caseína bovina reconstituidas a partir de leche en polvo descremada. Se aplicaron diseños de experimentos que permitieron evaluar la significancia de los factores independientes pH y temperatura sobre las variables dependientes o respuestas analizadas (actividad coagulante de micelas de caseína, tamaño medio de poros y parámetros de textura). Se obtuvieron ecuaciones modelo que permitieron evaluar y predecir el comportamiento de los sistemas bajo las diferentes condiciones ensayadas. A los sueros, producto de la sinéresis al final de este proceso de coagulación, se les determinó la capacidad antioxidante utilizando los métodos anteriormente enunciados.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia del tema

La leche es el primer alimento que recibe el hombre y, a lo largo de su vida, constituye junto con los derivados lácteos un complemento indispensable en su dieta. Los productos lácteos son considerados alimentos completos por su calidad nutritiva ya que aportan prácticamente todos los nutrientes que se requieren para el crecimiento y el desarrollo del ser humano.

Por otra parte, gracias al consumo generalizado, continuo y más o menos regular de estos productos, es que se los utiliza como vehículo de aporte de diferentes compuestos, tanto nutrientes esenciales añadidos con el fin de complementar el contenido nutritivo de la leche, como ingredientes funcionales de diversos orígenes a los que se atribuyen propiedades beneficiosas para la salud. De esta manera, se logra hacer llegar estos ingredientes adicionados al amplio espectro de población que consume habitualmente productos lácteos.

Desde el punto de vista tecnológico, las características fisicoquímicas y reológicas de los diferentes derivados lácteos, así como los procesos tecnológicos empleados en su fabricación, condicionan el tipo y las dosis de ingredientes que van a poder ser incorporados.

La amplia diversidad de productos lácteos que se producen, constituyen una base alimenticia que, gracias a su amplio consumo y versatilidad, se está utilizando para incorporar y acercar a todos los sectores de la población nuevos ingredientes funcionales. Estos complementos nutritivos y/o funcionales otorgan valor agregado a los productos lácteos, lo que representa una ventaja para las empresas productoras.

1.2. La leche

La leche humana es consumida sin cambios por el recién nacido. Sin embargo, el hombre ha consumido la leche de otras especies por lo menos desde hace 8.000 años. Varias especies se han utilizado para la producción de leche, pero hoy en día el ganado, especialmente *Bos taurus*, es la principal especie lechera, representando ~85% de la producción total. Las otras especies lecheras importantes son el búfalo (*Bubalus bubalis*) (11%), cabras y ovejas (2% cada uno); otras especies son significativas solo en ciertas regiones o para ciertos propósitos.

La leche es a menudo descrita como un alimento "casi perfecto". Aunque esto es cierto sólo para los jóvenes de las especies que la producen o de especies relacionadas, la leche de todas las especies es rica en nutrientes y es un alimento bien balanceado [1-2].

Sin embargo, es muy susceptible al crecimiento de microorganismos, lo que puede causar deterioro si la misma se almacena. Para contrarrestar esto, el hombre ha desarrollado una gama de productos que son más estables que la leche y poseen características organolépticas deseables

además de su valor nutricional; algunos de ellos datan de 4.000 años AC. Hoy en día, varios miles de productos alimenticios se producen a partir de la leche. Estos se dividen en los siguientes grupos principales: leche líquida/bebidas (40%), queso (35%), leche en polvo (15%), leches concentradas (2%), productos de leche fermentada (2%), manteca, helado, leche maternizada, cremas, productos ricos en proteínas y lactosa. Algunos de estos grupos son muy diversos, por ejemplo, se han enumerado 1.400 variedades de queso [3].

1.3. Composición de la leche

La leche es un líquido muy complejo que contiene varios cientos de especies moleculares. Los componentes principales son agua, lípidos, azúcar (lactosa) y proteínas. Además, hay numerosos constituyentes menores, sobre todo a nivel de trazas, por ejemplo minerales, vitaminas, hormonas, enzimas y compuestos misceláneos. La química de estos compuestos es generalmente similar en todas las especies, pero en muchos casos su estructura difiere en detalle, reflejando los cambios evolutivos. La concentración de los principales componentes varía ampliamente entre especies: lípidos, 2-55 %; proteínas, 1-20 %; lactosa, 0-10 %, reflejando principalmente las necesidades de energía (lípidos y lactosa) y la tasa de crecimiento (principalmente proteínas) del neonato. Las concentraciones de los constituyentes menores también varía ampliamente [3].

1.4. Componentes de la leche

1.4.1. Carbohidratos

El principal carbohidrato de la leche en la mayoría de las especies es el disacárido reductor lactosa, que se compone de galactosa y glucosa unidas por un enlace glicosídico β 1-4. Su concentración varía de 0 a ~10 % [4].

La leche es la única fuente conocida de lactosa, la cual es una fuente disponible de energía para el recién nacido, proporcionando 30% de las calorías en la leche bovina y sirviendo como una alternativa a los lípidos de mayor aporte energético. Leches con una alta concentración de lactosa tienden a tener niveles más bajos de lípidos [5].

Además de la lactosa, un gran número de otros sacáridos libres se han encontrado en la leche; los diferentes tipos, su concentración y sus proporciones muestran grandes diferencias entre especies. Los oligosacáridos son la forma más común, pero pequeñas cantidades de monosacáridos también están presentes y algunas proteínas de la leche, especialmente la κ -

caseína (κ -CN), están glicosiladas. Hay bajos niveles de glicoproteínas altamente glicosiladas, especialmente mucinas, y glicolípidos en la membrana de los glóbulos de grasa de la leche.

1.4.2. Lípidos

Los lípidos de la leche son muy complejos químicamente y existen como una emulsión única. El nivel de grasa en la leche muestra grandes diferencias entre especies, que van desde ~2% a ~50%, y los mismos aportan 2,5 veces más energía que la lactosa [4].

1.4.3. Proteínas

Las propiedades de la leche y la mayoría de los productos lácteos están determinadas por las proteínas que contienen en mayor medida que por cualquier otro constituyente. Las proteínas lácteas también tienen muchas propiedades únicas; debido a esto y su importancia tecnológica, las mismas han sido ampliamente estudiadas [6].

1.4.3.1. Proteínas del suero lácteo

Las proteínas de suero de leche (WP, por sus siglas en inglés) representan alrededor del 20 % de las proteínas totales de la leche bovina. El total de la fracción de WP se obtiene mediante cualquiera de los métodos para la separación de las caseínas (CN), es decir, las proteínas que son solubles a pH 4,6 o en NaCl saturado, o después de la coagulación de las CN inducida por cuajo. Las WP son permeables en la microfiltración y no sedimentan por ultracentrifugación. Las mismas tienen propiedades fisicoquímicas y funcionales de relevancia y su uso se ha incrementado en la industria alimenticia debido a su habilidad para formar emulsiones, espumas y geles [3].

El suero líquido, que queda después de la precipitación isoeléctrica de las CN de la leche descremada o leche entera, es una solución diluida de WP (~0,7 % en leche bovina), lactosa, sales orgánicas e inorgánicas, vitaminas y varios constituyentes a niveles de trazas.

A escala comercial, productos enriquecidos en WP se pueden obtener por [3, 7-8]:

- Ultrafiltración/diafiltración de la leche o del suero lácteo para remover grandes cantidades de lactosa, y posterior secado *spray* para producir concentrados de proteínas del lactosuero (WPC, por sus siglas en inglés; 30-85 % proteína).
- Cromatografía de intercambio iónico y secado *spray* para obtener aislados de proteínas del lactosuero (WPI, por sus siglas en inglés; ~95 %).
- Desmineralización por electrodiálisis o intercambio iónico, evaporización térmica del agua y cristalización de la lactosa.

- Desnaturalización térmica, remoción de la proteína precipitada por filtración/centrifugación y secado *spray* para obtener lactoalbúmina, la cual posee baja solubilidad y poca funcionalidad.

Las WP son de naturaleza globular y las principales, que determinan sus propiedades funcionales, son:

- La β -Lactoglobulina (β -Lg), la cual representa el ~50 % de las WP y cerca del 12 % de las proteínas totales de la leche bovina. Es una típica proteína globular y es la principal proteína del suero en la leche de vaca, búfalo, oveja y cabra, aunque existen leves diferencias interespecie [9]. La β -Lg es la proteína más alergénica de la leche bovina para los infantes humanos, por lo que existe interés en productos de WP libres de β -Lg para el uso en fórmulas para infantes. Adicionalmente, la β -Lg posee muy buenas propiedades termogelantes y determina la gelación de las WP.

- La α -Lactoalbúmina (α -La) representa cerca del 20 % del suero lácteo bovino (3,5 % de las proteínas totales de la leche). Es una pequeña proteína que contiene 123 residuos de aminoácidos, con una masa molar de ~14 kDa [10-11].

- La albúmina sérica (0,1-0,4 g.L⁻¹), la cual no posee función biológica conocida y tiene poco efecto sobre las propiedades fisicoquímicas de WPC y WPI.

1.4.3.2. Caseínas (CN)

Hay cuatro tipos principales de CN, a saber, α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN y κ -CN. Las mismas son fosfoproteínas específicas de la leche, con alto contenido de fosfato inorgánico (P_i) y que precipitan a pH 4,6. En general, tienen tendencia a asociarse entre sí y autoasociarse en las condiciones de pH y fuerza iónica de la leche; aunque presentan ciertas diferencias frente a los niveles de Ca²⁺ y a la temperatura del medio. Forman complejos tanto en presencia como en ausencia de Ca²⁺ [12].

Dentro de las CN hay diversas características que las diferencian entre sí basadas en su distribución de carga y su sensibilidad a la precipitación por Ca²⁺. Esto último permite separarlas en dos fracciones: las sensibles al Ca²⁺ y las insensibles a él. La fracción insensible al Ca²⁺ actúa como protectora del resto de las CN frente a la precipitación por acción de este catión [13]. El número promedio de iones calcio unidos a un monómero de proteína crece con el incremento del pH y la disminución de la fuerza iónica. Esta capacidad de unión al Ca²⁺ aparece como un proceso completamente reversible y disminuye en el orden α_{s1} -CN > β -CN > κ -CN [14]. Esta aptitud les da a las CN una importancia nutricional esencial, como es la biodisponibilidad del

calcio asociado a las mismas [13, 15]. Aunque la solubilidad y la estabilidad coloidal de las CN bovinas en presencia del ion calcio han sido estudiadas por diferentes autores desde puntos de vistas termodinámicos y cinéticos [16-17], las investigaciones con respecto a las CN ovinas han tenido menor atención.

Los distintos tipos de CN se encuentran en todas las especies mamíferas estudiadas hasta el momento, aunque su proporción varía ampliamente según la especie y posean características que las diferencian:

- ♦ α_{s1} -CN: Es una proteína altamente fosforilada, por lo cual tiene una gran capacidad para fijar iones calcio. La α_{s1} -CN bovina existe en dos formas, una mayoritariamente y una minoritaria, conteniendo 8 y 9 grupos P_i /mol proteína respectivamente [6, 18-19]. Las α_{s1} -CN contienen múltiples sitios de fosforilación incluyendo una importante región entre los residuos 100-110 [20]. La α_{s1} -CN de la leche de oveja es muy heterogénea, hasta el momento han sido identificadas diez variantes genéticas; no sólo las propiedades de las variantes difieren, sino también la concentración de α_{s1} -CN varía de 0 a 26 % de la CN total, y, en consecuencia, el contenido total de proteína varía considerablemente.

- ♦ α_{s2} -CN: Al igual que las α_{s1} -CN, se hallan altamente fosforiladas. La leche bovina contiene 4 isoformas fosforiladas que contienen de 10-13 grupos P_i /mol proteína [19, 21-22].

- ♦ β -CN: Son particularmente ricas en glutamina, y si se compara entre diversas especies, la ubicación de las mismas en la secuencia primaria está muy conservada. Poseen también un importante sitio de fosforilación cerca de la región N-terminal [20]. Este número de sitios y el grado de fosforilación son menores en comparación a las α_{s1} -CN y α_{s2} -CN. La β -CN bovina existe como una única forma fosforilada conteniendo 5 grupos P_i /mol proteína [20].

- ♦ κ -CN: Esta fosfoglicoproteína difiere de las CN sensibles al calcio en ciertas características. Es la única CN que es soluble en presencia de dicho catión y posee menor contenido de grupos P_i en comparación a las restantes CN (la κ -CN bovina sólo posee uno). Los sitios de fosforilación se concentran en la región C-terminal de la molécula y se encuentran en sitios individuales en lugar de presentarse en grupos como los encontrados para las CN sensibles al ion calcio. La característica más importante es su sensibilidad a la quimosina, por acción de la cual se escinde en dos macropéptidos. Para la κ -CN bovina se ha demostrado que el clivado ocurre en un enlace Phe-Met específico que se encuentra en la región C-terminal [23-24]. Los productos de este clivado son un fragmento C-terminal altamente cargado y glicosilado (caseinomacropéptido) y otro fragmento N-terminal hidrofóbico (para- κ -caseína).

Para la leche bovina, los cuatro tipos principales de CN $\alpha_{s1}:\alpha_{s2}:\beta:\kappa$ se encuentran en una proporción en peso de 3:1:3:1,3 [25-26].

Los caseinatos (CAS), sales de las CN, se pueden obtener a partir de la precipitación de las CN de las MC mediante la reducción del pH hasta 4,6; seguido de una disolución del precipitado con una solución de hidróxido. Si se utiliza hidróxido de sodio, se obtiene caseinato de sodio (NaCAS). Los CAS son usados extensamente en la industria alimentaria debido a sus propiedades fisicoquímicas, nutricionales y funcionales, las cuales los convierten en ingredientes y/o aditivos útiles de preparaciones alimenticias complejas.

Las partículas de NaCAS se encuentran en solución acuosa como moléculas proteicas individuales, oligómeros proteicos y hasta como submicelas de CN [27]. Los CAS pueden estar asociados a iones sodio, calcio, potasio, amonio y magnesio, dando lugar a propiedades funcionales diferentes.

En general los CAS poseen, al pH isoiónico, carga neta negativa, estructura flexible que da lugar a la formación de soluciones viscosas, alta solubilidad en agua, zonas hidrofóbicas que favorecen la disposición de agua estructurada como así también la interacción con lípidos y estabilidad al calor. Estas propiedades estructurales y fisicoquímicas los convierten en excelentes nutrientes y les otorga propiedades funcionales diversas. Son ampliamente utilizados en tecnología de los alimentos como ingredientes alimentarios o aditivos debido a sus capacidades emulsificantes, de retención de agua y gelificantes, por su resistencia a tratamientos al calor y por su contribución a la textura y sabor del alimento [28].

1.4.3.3. Micelas de caseína (MC)

A nivel ultraestructural, las MC son similares en la mayoría de las especies. La microscopía electrónica muestra que las MC son esferas con un diámetro en el rango de 50-500 nm (promedio ~120 nm) y una masa que oscila entre 10^6 a $3 \cdot 10^9$ Da (promedio $\sim 10^8$ Da). Hay numerosas MC pequeñas, pero éstas sólo representan una proporción minoritaria de la masa. Hay 10^{14} - 10^{16} micelas/mL de leche, y se encuentran aproximadamente a dos diámetros de micelas (~250 nm) de distancia [3]. La masa seca de las micelas es ~94 % de proteína y 6 % especies de bajo peso molecular, que consisten principalmente de fosfato de calcio, con un poco de magnesio y citrato y cantidades traza de otras especies, denominados colectivamente como fosfato de calcio coloidal (FCC) [29]. Las MC contienen ~3,9 g H₂O/g de proteína, lo que les otorga una alta voluminosidad (4,4 mL.g⁻¹ proteína) [30]. Dispersan la luz y el color blanco de la leche se debe a este fenómeno; el color blanco se pierde si las micelas son disgregadas por disolución del

FCC con citrato, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) u oxalato, mediante el aumento de pH, o por empleo de urea (>5 M) o etanol (~35 % a 70 °C) [29].

Aunque las opiniones sobre la estructura detallada de la MC se encuentran divididas, existe consenso o unanimidad sobre su estructura general y propiedades. Las MC tienen una estructura abierta, como una esponja. La estructura micelar es suficientemente abierta como para permitir que macromoléculas relativamente pequeñas (enzimas) difundan al interior. Las CN solubles pueden estar incorporadas dentro de los intersticios micelares sin que esto cambie el radio hidrodinámico de las MC. Son notablemente estables ya que soportan altas velocidades de centrifugación (homogenización), altas temperaturas (pasteurización) y tienen facilidad para redispersarse después de la deshidratación de la leche a polvo o gránulos.

Existen diferentes modelos propuestos para justificar las propiedades de estas MC. Entre ellos podemos mencionar el modelo de “submicelas de caseínas” propuesto por Walstra o el modelo de “malla” o “red” propuesto por Holt [31]. Ambos modelos estructurales coinciden en que la κ -CN se halla localizada mayoritariamente en la superficie de la micela, con una porción hidrofóbica hacia el interior micelar y otra hidrofílica que se extiende hacia el medio en forma de “pelos”. La κ -CN desempeña un papel esencial en la regulación del tamaño micelar y en el mantenimiento de la estabilidad de las MC en suspensión en la leche. La proporción de κ -CN varía en relación inversa con el tamaño de la micela, mientras que la de β -CN lo hace en forma directa [32].

La estabilidad de las MC es crítica para muchas de las propiedades tecnológicamente importantes de la leche y, en consecuencia, ha sido el centro de muchas investigaciones, especialmente durante los últimos 50 años [33-37]. Las MC se mantienen estables debido a factores electrostáticos y estéricos [12]. Los aspectos electrostáticos están reflejados en el hecho de que pueden ser agregadas al pH del punto isoelectrico de las CN y a que la velocidad de agregación a pH neutro es sensible a la concentración de Ca^{2+} . Esta estabilidad electrostática se debe a que, al pH de la leche, los grupos aspárticos y glutámicos de la κ -CN superficial se encuentran cargados negativamente. Esto impide el acercamiento de las MC por repulsión electrostática [29].

Al mismo tiempo, existe una repulsión estérica adicional que proporciona estabilidad coloidal, la cual se da por dos mecanismos [38]. En el primer caso, si la presencia de una segunda micela restringe la libertad de movimiento de los “pelos” flexibles sobre la superficie de otra micela, esto siempre causa repulsión. Este mecanismo se conoce como término de restricción de volumen y su magnitud es proporcional a la densidad de la “capa peluda”. En el

segundo caso, si las “capas peludas” de dos MC se interpenetran, la calidad del solvente (suero lácteo) determina que este término, llamado de mezclado, sea repulsivo (repulsión osmótica) [39].

Por lo tanto, la estabilidad frente a la agregación se debe principalmente a la repulsión electrostática y estérica causada por los “pelos” de κ -CN. Pero si se eliminan o colapsan estos “pelos”, se produce la desestabilización de las MC y posterior agregación espontánea de las mismas [38, 40-41].

1.4.3.4. Comparación entre las CN y WP

Algunos aspectos fundamentales en que se diferencian:

- Solubilidad a pH 4,6. Las CN son, por definición, insolubles a pH 4,6, mientras que las WP son solubles en las condiciones iónicas de la leche. La precipitación isoeléctrica de las CN se aprovecha en la obtención de CN y CAS (sales de las CN), productos lácteos fermentados y quesos ácido-coagulados.

- Coagulación seguida de proteólisis limitada. Las CN se pueden coagular seguidas de proteólisis específica limitada, mientras que las WP no poseen esta propiedad. Esta propiedad de las CN es aprovechada en la producción de quesos cuajo-coagulados (~75 % de todo los quesos).

- Estabilidad térmica. Las CN son muy estables al calor. La leche a pH 6,7 puede calentarse a 100 °C durante 24 h sin coagulación y resistir el calentamiento a 140 °C durante un máximo de 20-25 min. Además, soluciones acuosas de NaCAS se pueden calentar a 140 °C durante varias horas sin cambios evidentes. La estabilidad térmica de las WP es la típica de las proteínas globulares. Las mismas se desnaturalizan por completo cuando son sometidas a calentamiento durante 10 min a 90 °C. La alta estabilidad al calor de las CN, que es probablemente debido a su falta de estructuras secundarias y terciarias estables, permite la producción de productos lácteos esterilizados con calor con relativamente pequeños cambios físicos.

- Composición aminoacídica. Las CN contienen altos niveles de prolina (17 % de todos los residuos en la β -CN), lo que explica su falta de estructuras α -helice y lámina- β . Se encuentran fosforiladas, mientras que las principales WP no. El grado de fosforilación varía entre las CN individuales. La presencia de grupos P_i tiene gran significado para las propiedades de las CN, por ejemplo, (i) carga molecular y propiedades relacionadas y estabilidad al calor; y (ii) de unión a metales que afecta a sus propiedades fisicoquímicas, funcionales y nutricionales. La unión de las CN a los metales es considerada una función biológica debido a que permite que una alta concentración de fosfato de calcio se transporte en la leche en una forma soluble (para

suministrar los requisitos del neonato). Caso contrario, el fosfato de calcio precipitaría y bloquearía los conductos de la glándula mamaria, que conduce a la muerte de la glándula y quizás del animal.

- Contenido de azufre. Las CN contienen un bajo contenido de azufre (0,8 %) mientras que las WP poseen un contenido relativamente alto (1,7 %). El azufre en la CN se encuentra principalmente como metionina, con poca cistina o cisteína, aunque las principales CN están desprovistas de estos aminoácidos. Las WP son relativamente ricas en cisteína y/o cistina, las cuales tienen mayores efectos sobre las propiedades fisicoquímicas de estas proteínas y de la leche.

- Estado físico en la leche. Las WP existen en la leche como monómeros o como pequeñas estructuras cuaternarias, mientras que las CN existen como grandes agregados, conocidos como micelas de caseína, con una masa $\sim 10^8$ Da y conteniendo cerca de 5.000 moléculas.

1.4.3.5. Propiedades moleculares de las WP y de las CN

Las WP son muy estructuradas, pero los cuatro tipos de CN carecen de estructuras secundarias estables. Consideraciones teóricas indican que son moléculas muy flexibles y se las refiere como proteínas reomórficas [42-44]. La incapacidad de las CN para formar estructuras estables se debe principalmente a su alto contenido de prolina. La estructura abierta y flexible de las CN las hace muy susceptibles a la proteólisis, lo que facilita su función natural como fuente de aminoácidos.

En contraste, las WP, especialmente la β -Lg, son bastante resistentes a la proteólisis. Esta característica es importante porque la mayoría de las WP de la leche no desempeñan una función nutricional.

Las CN se consideran generalmente proteínas muy hidrofóbicas pero, con la excepción de la β -CN, no son excepcionalmente hidrofóbicas. Debido a su falta de estructuras secundarias y terciarias estables, la mayoría de sus residuos hidrofóbicos están expuestos y, en consecuencia, tienen una alta hidrofobicidad superficial. Una de las características más notables de la secuencia de aminoácidos de las CN es que los residuos hidrofóbicos e hidrofílicos no están distribuidos uniformemente, dando así a las CN una estructura claramente anfipática. Esta característica, junto con su estructura abierta y flexible, les otorga buena actividad superficial, y buenas propiedades espumantes y emulsificantes, por lo que las CN son las proteínas funcionales de elección para muchas aplicaciones. Sin embargo, debido a sus secuencias hidrofóbicas, las CN tienen una propensión a producir hidrolizados de sabor amargo. También debido a su estructura

abierta, las CN tienen un alto volumen específico y, en consecuencia, forman soluciones altamente viscosas. Adicionalmente, la falta de una estructura terciaria estable implica que las CN no son desnaturizables en sentido estricto y, en consecuencia, son extremadamente estables al calor.

Las CN tienen una fuerte tendencia a asociarse, debido principalmente a uniones hidrofóbicas. Incluso en el NaCAS, la forma más soluble de las CN, las moléculas forman agregados de 250-500 kDa, es decir, que contiene 10 a 20 moléculas. Esta fuerte tendencia a asociarse hace que sea difícil fraccionar las CN, para lo que se requiere un agente de disociación, por ejemplo, urea o SDS. Por otro lado, una tendencia a asociarse es importante para algunas aplicaciones funcionales y en la formación y estabilización de las MC. En contraste, las WP se dispersan molecularmente en solución acuosa.

Debido a su alto contenido de grupos P_i , los cuales se encuentran agrupados en ciertos sectores de la secuencia aminoácida, las α_{s1} -, α_{s2} - y β -CN tienen una fuerte tendencia a unirse a iones metálicos que, en el caso de la leche bovina, son principalmente iones Ca^{2+} . Esta propiedad tiene muchas consecuencias importantes; la más importante desde el punto de vista tecnológico es que estas tres proteínas, que representan aproximadamente el 85 % de la CN total, son insolubles en concentraciones de $Ca^{2+} > \sim 6$ mM a temperaturas > 20 °C. Como la leche bovina contiene alrededor de 30 mM de Ca^{2+} , se esperaría que las CN precipitaran en las condiciones que prevalecen en la leche. Sin embargo, la κ -CN, que contiene sólo un grupo P_i orgánico, une al Ca^{2+} débilmente y es soluble en todas las concentraciones de Ca^{2+} que se encuentran en los productos lácteos.

Además, cuando la κ -CN se mezcla con las CN sensibles al Ca^{2+} , la misma puede estabilizar y proteger hasta 10 veces la masa de las mismas mediante la formación de MC. Las MC actúan como portadores de elementos inorgánicos, especialmente calcio y fósforo, pero también magnesio y zinc, y son, por lo tanto, muy importantes desde el punto de vista nutricional. A través de la formación de micelas, es posible solubilizar mayores niveles de calcio y P_i , que de otro modo no sería posible.

1.4.3.6. Comparación interespecie

Las leches de las especies de las que se tienen datos muestran diferencias considerables con respecto al contenido de proteínas, de ~ 1 a ~ 20 %. El contenido de proteína refleja la tasa de crecimiento del neonato de la especie, es decir, sus requerimientos por los aminoácidos

esenciales [3]. Las leches de todas las especies contienen los dos grupos de proteínas mencionados previamente: CN y WP, pero la proporción de estas varía ampliamente.

En la leche de oveja, el contenido de minerales y vitaminas es mayor que el encontrado en la leche bovina y el contenido promedio de proteínas (5,8 %) es mayor que el encontrado en leche bovina (3,3 %) [45]. La misma se utiliza principalmente para la producción de quesos, con pequeñas cantidades utilizadas para la producción de leches fermentadas. La aptitud quesera es mayor que la de leche bovina y se coagula más rápido. Su rendimiento es mayor con respecto al de otras leches, como las de vaca y cabra. Por lo tanto, la coagulación y las propiedades de formación de los coágulos de la leche de oveja son particularmente importantes.

1.4.4. Otros componentes

1.4.4.1. Sales

La leche contiene protones y cationes calcio, magnesio, sodio y potasio junto con los aniones cloruro, citrato y P_i . Estos componentes se encuentran en concentraciones en un rango de 5 a 40 mM [46].

La solubilidad y el estado de ionización de muchas de las principales especies iónicas se encuentran interrelacionadas, especialmente H^+ , Ca^{2+} , P_i y citrato. Estas relaciones tienen efectos importantes sobre la estabilidad del sistema de CN y, en consecuencia, sobre el procesamiento de la leche. El estado de los diversos componentes de la leche puede ser modificado mediante la adición de ciertas sales, por ejemplo, la concentración de Ca^{2+} se reduce mediante la adición de P_i o citrato; la adición de $CaCl_2$ afecta la distribución y el estado de ionización del Ca^{2+} y el P_i , y el pH de la leche.

1.5. Sistemas modelos de alimentos

Los alimentos fabricados o elaborados generalmente comprenden una mezcla de componentes constituidos por lípidos, proteínas, hidratos de carbono simples y complejos, emulsificantes y sales, los cuales son capaces de interactuar entre sí y de modificar las características finales del alimento. A menudo, el procesamiento utilizado en la fabricación del alimento también modifica estas interacciones. Los sistemas modelo de alimentos fueron primero desarrollados debido a la disparidad entre las pruebas funcionales de laboratorio para las proteínas y la funcionalidad en el alimento. Esta disparidad resulta de la alteración de la funcionalidad y la estructura de la proteínas a través de interacciones entre los diversos componentes, así como por los cambios producidos debido a tratamientos térmicos y de cizalla durante el procesamiento [47].

Los sistemas modelo de alimentos hoy encuentran utilidad para la investigación de la funcionalidad de otros componentes de los alimentos, incluyendo almidones, gomas y emulsificantes. Por lo tanto, estos sistemas proporcionan un medio para determinar cómo los ingredientes y el procesamiento alteran las características del producto final, así como la evaluación de la sensibilidad de las características de los alimentos hacia los diferentes ingredientes y hacia los pasos de procesamiento. Se basan en la formulación y elaboración de alimentos reales, utilizando instalaciones de laboratorio y planta piloto. Generalmente, se eliminan los ingredientes que no tienen un efecto principal sobre las características finales del producto. Una posible limitación es el uso de equipo de procesamiento que no se escala hasta equipamiento comercial.

1.5.1. Propiedades funcionales de las proteínas

Las principales propiedades funcionales de las proteínas en los alimentos son: solubilidad, poder emulsificante y gelificante, formación y/o estabilización de espumas, capacidad de unión del agua y estabilidad al calor [48]. Diferentes tipos de alimentos tienen distintos requerimientos funcionales y pueden requerir múltiples funcionalidades.

Los tratamientos térmicos, variaciones de pH, fuerza iónica, concentración de determinados iones o azúcares, etc, pueden provocar cambios significativos en la estructura de CN, CAS y WP que se reflejan en modificaciones de sus propiedades funcionales. Entre dichas propiedades, la formación de geles representa un tópico de gran relevancia económica [49], que puede ser mejorada vinculando la estructura proteica con los mecanismos moleculares involucrados con dicha propiedad funcional [50].

Durante la formulación de un gel alimenticio, la composición del sistema, las interacciones entre sus componentes y las condiciones del proceso afectan las propiedades mecánicas de dicho gel y, por lo tanto, su textura [51].

1.6. Geles de proteínas lácteas

La coagulación de las MC es la base para la fabricación de los quesos y otros productos lácteos fermentados (yogurt, postres ácidos). Las proteínas lácteas en suspensión pueden ser desestabilizadas por diferentes tratamientos, como el calentamiento (WP), el uso de la enzima del cuajo (MC) y la acidificación (MC y WP desnaturalizadas). Las combinaciones de estos procesos se pueden utilizar para elaborar productos lácteos.

Los geles proteicos lácteos son en general irreversibles, en contraste con muchos geles de polisacáridos que son termorreversibles. Los geles lácteos son a menudo clasificados como geles

particulados aunque ahora se reconoce que no son geles de partículas simples, ya que la estructura interna de las CN juega un papel importante en las propiedades reológicas de dichos geles [52-53]. Las propiedades de los geles de proteínas de la leche han sido revisadas por diversos autores [49, 54-56].

1.6.1. Geles de CN

La gelificación de las CN puede ser inducida enzimáticamente o por acidificación, disminuyendo la estabilidad estérica y/o electrostática, causando agregación [57]. Esto constituye la primera etapa en la fabricación de los quesos y otros productos lácteos fermentados.

En la gelificación inducida enzimáticamente, la gelación o coagulación comienza con la hidrólisis de la κ -CN, la cual se escinde para dar dos macropéptidos, uno hidrofóbico del extremo N-terminal (que queda unido a las micelas de para-caseína) y otro hidrofílico del extremo C-terminal (caseinomacropéptido) [12]. Luego ocurre la agregación o floculación espontánea de las micelas de para-caseína para formar agregados que crecen y se reordenan hasta generar una malla de gel o coágulo [58-59].

En la gelación ácida, la acidificación conduce a la agregación de las partículas de CN como resultado principalmente de una neutralización de cargas. La agregación ocurre por la formación de cadenas y agrupamientos proteicos los cuales se encuentran unidos entre sí para formar un entramado tridimensional [60]. Los geles ácidos de CN se pueden formar a partir de NaCAS. Una manera de formar geles ácidos es la acidificación directa de la leche a bajas temperaturas seguida o no de un calentamiento (descenso rápido del pH). El pH se puede reducir lentamente por la adición de cultivos bacterianos que consumen principalmente la lactosa generando ácido láctico, el cual se disocia en lactato y protones. La glucono- δ -lactona (GDL) es también usada para acidificar la leche, presentando estos geles ácidos diferentes propiedades reológicas y estructurales respecto de aquellos producidos por cultivos bacterianos [61]. Esta diferencia en la velocidad del proceso puede afectar el grado de dureza y elasticidad del gel formado [62]. El uso de la GDL ha adquirido mayor atención debido a que en su empleo se evitan potenciales complicaciones relacionadas con los cultivos iniciadores bacterianos y se puede controlar la velocidad de acidificación mediante la variación de la concentración de GDL y la temperatura de trabajo [63].

1.6.2. Geles de WP

1.6.2.1. Gelación fría

Los geles también se pueden producir mediante un proceso en dos etapas que implica un tratamiento con calor a baja fuerza iónica y/o lejos del punto isoeléctrico, seguido de una brusca disminución de temperatura y posterior aumento de la fuerza iónica y/o un ajuste de pH [64-65].

Este proceso se conoce como gelación fría, debido a que el primer tratamiento térmico produce desnaturalización proteica y formación de agregados proteicos solubles al pH isoiónico, mientras que, en una segunda etapa, la gelificación se puede producir a bajas temperaturas a través del apantallamiento de las fuerzas repulsivas por disminución del pH del medio.

Debido a que la gelación en frío permite que la estructura del gel sea introducida sin calentamiento del producto final, puede ser una alternativa atractiva de los ingredientes espesantes corrientemente utilizados [66].

1.7. Componentes bioactivos en la leche y en los productos lácteos

La visión tradicional del rol de la leche ha sido expandida más allá del horizonte del sostenimiento nutricional del infante. Aparte del valor nutricional de la leche, compuestos activos biológicamente y encriptados en las proteínas lácteas (CN y WP) han demostrado ser importantes para las funciones fisiológicas y bioquímicas, las cuales tienen impacto crucial en el metabolismo y la salud humana [67-69]. El término componente bioactivo refiere tanto a compuestos que existen naturalmente en los alimentos, como a los que se forman y/o son formulados durante el procesamiento del alimento y que pueden tener funciones fisiológicas y bioquímicas para el ser humano [70].

Se considera comunmente a la leche como un alimento funcional debido a que contiene diversos componentes bioactivos. Y debido a su composición química y propiedades estructurales, también se comporta como un vehículo adecuado para formular alimentos funcionales. La composición de la leche es muy variable entre diferentes especies, y tales peculiaridades están atrayendo la atención de los formuladores de alimentos, con el propósito de desarrollar productos lácteos con sabores y texturas específicas. En este sentido, el contenido de proteína de la leche ovina es casi dos veces mayor que la de la leche bovina [45], lo que representa una valiosa fuente de CN y CAS, que podrían ser utilizado como ingredientes funcionales en la industria alimentaria.

1.7.1. Rol del calcio

Los altos niveles de calcio tienen un papel importante en el desarrollo, fortalecimiento y densidad de los huesos en los niños y en la prevención de la osteoporosis en la edad adulta. También, se ha demostrado que el calcio es beneficioso para la reducción de la absorción del colesterol y en el control del peso corporal y la presión sanguínea [70].

1.7.2. Péptidos encriptados y biológicamente activos

Recientemente se ha descubierto que todas las proteínas de la leche contienen secuencias que tienen actividades biológicas/fisiológicas cuando son liberadas por proteólisis. Los más estudiados son los fosfopéptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, péptidos opiáceos, inmunomoduladores y caseinomacropéptidos, los cuales tienen diversas propiedades biológicas [71-73].

1.7.3. Obtención de los péptidos con potencial actividad biológica

Las enzimas proteolíticas de origen animal, vegetal, y microbiano son ampliamente empleadas en la industria alimentaria [74]. La hidrólisis tiene como objetivos mejorar la estabilidad térmica, reducir alergenicidad, modelar cantidad y tamaño de péptidos para dietas especiales, alterar propiedades funcionales de gelificación, emulsificación y formación de espumas [75-76].

Se las puede utilizar para la hidrólisis de proteínas lácteas con el objetivo de la liberación de péptidos bioactivos codificados en la estructura de la proteína [77-78]. Las formulaciones con WP hidrolizado son beneficiosas para los niños con intolerancia a la leche bovina y recientemente se demostró que la hidrólisis enzimática parcial de WP resulta en la formación de nanopartículas que permiten la formación de geles de elevada transparencia, reversibles y con potencial para la encapsulación de moléculas específicas [79].

El amplio abanico de posibilidades promovido por la hidrólisis de proteínas ha fomentado el interés en la búsqueda de nuevas proteasas adecuadas para aplicaciones particulares. El uso de enzimas proteolíticas de fuentes microbianas ofrece ventajas de producción a gran escala en un tiempo relativamente corto, proporcionando un suministro regular y abundante de enzimas [74].

Enzimas proteolíticas producidas por *Bacillus* pueden ser utilizadas para hidrolizar proteínas en sistemas alimentarios. Estas proteasas neutras generan menos amargor en hidrolizados de proteínas alimentarias que las proteasas de origen animal, por tanto, son de interés para la industria de alimentos. Su baja termotolerancia es ventajosa para el control de su reactividad durante la producción de los hidrolizados [80].

La obtención de péptidos bioactivos utilizando proteasas neutras se encuentra en etapa de experimentación, pero ya se ha comprobado la bioactividad de los mismos [81-82]. Por otra parte, se ha reportado la actividad biológica diversa de los caseinomacropéptidos [83-84], los cuales pueden ser recuperados del suero quesero.

Específicamente, cepas de *Bacillus* sp. P7 y P45, que evidenciaron crecimiento efectivo degradando harina de plumas de gallina, produjeron proteasas extracelulares durante su crecimiento en medios líquidos de bajo costo, presentando de esta manera potencial biotecnológico [85-86].

Por lo tanto, resulta de interés establecer las bases metodológicas para la evaluación del efecto de la hidrólisis enzimática y de la presencia de los productos originados sobre las propiedades funcionales y biológicas de proteínas lácteas de origen bovino y ovino.

La caracterización fisicoquímica de las proteínas modificadas enzimáticamente, a través del conocimiento de las interacciones y características estructurales frente a cambios de composición, fisicoquímicos o de procesamiento, permitirá vincularlas con sus propiedades funcionales, con miras a una transferencia a la industria alimentaria.

Además, debido a que estas proteínas y los péptidos derivados de las mismas pueden presentar actividad biológica, su inclusión en la formulación de productos alimenticios otorgaría valor agregado a dichos productos.

OBJETIVOS

Objetivo general: Otorgar valor agregado a productos alimenticios en cuyo proceso de elaboración tome parte la gelación proteica, por adición de péptidos bioactivos, producto de hidrólisis enzimática de proteínas lácteas de origen bovino y ovino.

Objetivos parciales:

- a) Evaluar el estado inicial de las caseínas bovinas y ovinas previo a la hidrólisis enzimática
- b) Caracterizar fisicoquímicamente los péptidos obtenidos por hidrólisis de proteínas de leche bovina y ovina por acción de proteasas neutras producidas por *Bacillus* aislados de peces de la cuenca Amazónica
- c) Investigar el efecto de la hidrólisis enzimática sobre las propiedades estructurales y poder gelificante de las proteínas de leche bovina y ovina
- d) Evaluar la bioactividad de los productos de hidrólisis

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. Reactivos químicos utilizados

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron de calidad pro-análisis. Los más utilizados fueron: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y NaN_3 – azida sódica – (Mallinckrodt Chemical; Dublin, Irlanda); HCl , NaOH , ácido acético glacial – HAc –, ácido tricloroacético – TCA –, persulfato de amonio – APS –, persulfato de potasio, etanol, sacarosa, lactosa monohidrato, FeCl_3 y CuSO_4 (Cicarelli; Santa Fe, Argentina); acetona, cloroformo, metanol y 3,5-Di-tert-butil-4-hidroxitolueno – BHT – (Biopak; Buenos Aires, Argentina); Tris(hidroximetil)aminometano – TRIS –, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $\text{N,N}'$ -metilénbisacrilamida – bis-acrilamida –, SDS y glicerol (Merck; Darmstadt, Alemania); azul de bromofenol y ferricianuro de potasio (Anedra; Buenos Aires, Argentina); β -mercaptoetanol – β - ME – y tetrametiletiléndiamina – TEMED – (BDH Chemicals, Québec, Canada); ácido trinitrobencensulfónico – TNBS –, ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzo-tiazolina 6-sulfónico) – ABTS –, ácido 8-anilino-1-naftalén sulfónico – ANS –, azocaseína; glucono- δ -lactona – GDL –, ácido etilendiaminotetraacético – EDTA –, ácido 3-(2-piridil)-5,6,-difeníl-1,2,4 triazina-p-p' disulfónico – ferrozina –, acrilamida, 2,2- difeníl-1-picril-hidrazil – DPPH –, azul brillante de Coomassie R250, reactivo de Folin-Ciocalteu, glicina, Na_2CO_3 , $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ – tartrato de sodio y potasio –, Rodamina B, tricina, urea y NH_4SO_4 (Sigma-Aldrich Argentina; Buenos Aires, Argentina) FeSO_4 (Vetec; Rio de Janeiro, Brasil); Agar-Agar tipo I (Himedia; Mumbai, India); Infusión cerebro-corazón – BHI – (Oxoid; Madrid, España); reactivo de Folin-Ciocalteu (Mercolab; Buenos Aires, Argentina); harina de pluma de gallina (Bunge; Brasil); papel de filtro Whatman N°40 (Whatman International Ltd; Kent, Reino Unido); soluciones reguladoras de pH (EM Science; New York, Estados Unidos) y leche en polvo descremada (Svelty-Nestlé Argentina; Buenos Aires, Argentina).

Se prepararon soluciones *stock* de cada una de las drogas en agua destilada a temperatura ambiente (23°C - 25°C) y de acuerdo a los requerimientos, se las valoró antes de utilizarlas. Las proteínas que se utilizaron para la preparación de soluciones testigo fueron NaCAS , β -Lg, α_{s1} -CN, β -CN, κ -CN, albúmina sérica de origen bovino, y pepsina porcina, adquiridas en Sigma-Aldrich (Argentina). El WPI fue proporcionado por Arla Foods Ingredients S. A (Dinamarca).

2.1.2. Preparación de soluciones

2.1.2.1. Soluciones de caseinato de sodio

El caseinato de sodio (NaCAS) bovino comercial se disolvió en agua destilada con agitación magnética durante 2 h hasta alcanzar la concentración final deseada. Se adicionó entre 0,01–0,02 %P/V de azida sódica como preservante microbiano y el mismo fue guardado en heladera a 4 °C. Para su uso la solución acuosa de NaCAS bovino se agitó 1 h a temperatura (T) ambiente (23-25 °C). En estas condiciones la misma tiene un pH isoiónico de 6,8.

El NaCAS ovino se obtuvo a partir de caseína (CN) ácida de leches de ovejas de raza Lacaune del sur de Brasil. La leche fue desgrasada por centrifugación a 10.000xg a 4 °C durante 10 min. Luego se acidificó hasta alcanzar pH 4,5 con HCl 1 M bajo agitación constante a 25 °C. Después de permanecer 30 min a 40 °C, la mezcla fue filtrada utilizando papel de filtro Whatman N°40 usando una bomba de vacío. La CN ácida precipitada se lavó con un *buffer* ácido acético/acetato de sodio pH 4,5 y luego con agua destilada, posteriormente se disolvió con la adición de NaOH 10 g.L⁻¹ hasta alcanzar pH 7,0 y luego nuevamente se precipitó. Se llevaron a cabo de esta manera 4 ciclos sucesivos de precipitación, lavado y redisolución. El precipitado final (CN ácida) se lavó con acetona y cloroformo para extraer los glóbulos de grasa remanentes [87-88].

El NaCAS ovino (10 g.L⁻¹) se preparó a partir de la disolución de 1 g de CN ácida ovina en 50 mL de NaOH 0,1 N. La disolución se ajustó a un pH final de 6,8 por adición de pequeños volúmenes de HCl 0,1 N y se llevó el sistema a un volumen final de 100 mL con agua destilada [89-90].

2.1.2.2. Preparación de las micelas de caseína (MC)

La MC se reconstituyeron al 10 %P/V a partir de leche en polvo descremada en una solución buffer TRIS-HCl 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M y pH variable (6,5-8,5). Las mismas se almacenaron 24 h a 4 °C en la oscuridad para su posterior utilización.

2.1.2.3. Soluciones de ANS

El ANS, como sal de amonio, fue usado sin más purificación. Para las experiencias espectrofluorométricas se preparó una solución acuosa madre 6 mM que se almacenó en la oscuridad a 4 °C.

Su concentración fue determinada por medidas de absorbancia utilizando un coeficiente de absortividad molar $\epsilon = 4.950 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 350 nm [91].

2.1.2.4. Soluciones reguladoras

La composición de las soluciones reguladoras (*buffers*) dependió de los requerimientos de la experiencia a realizar. Las mismas se realizaron a partir de la disolución de la droga sólida en agua destilada y se el pH se ajustó con agregados convenientes de soluciones de NaOH 0,1 M y/o HCl 0,1 M. La calibración del electrodo se efectuó con soluciones comerciales reguladoras de pH, teniendo en cuenta la T de trabajo. Los principales *buffers* utilizados fueron: Imidazol 0,2 M pH 6,8 para ensayos de estabilidad coloidal, TRIS-HCl 0,02 M pH 8 para hidrólisis enzimática, TRIS-HCl 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M y pH variable (6,5-8,5) para ensayos de coagulación, TRIS-HCl 1,5 M pH 8,8 y 0,5 M pH 6,8 para electroforesis, fosfato 0,212 M, pH 8,2 para determinación de grado de hidrólisis, fosfato 0,2 M, pH 6,6 para la determinación de poder reductor, fosfato 0,005 M pH 7,0 para determinación de la actividad secuestradora del radical ABTS^{•+}.

2.1.2.5. Preparación de muestras, soluciones y geles para electroforesis

Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) o en presencia de SDS y tricina (tricina-SDS-PAGE)

2.1.2.5.1. SDS-PAGE

Se prepararon soluciones acuosas *stock* de acrilamida conteniendo 30 %P/V de acrilamida y 0,8 %P/V de bis-acrilamida, de *buffers* TRIS-HCl 1,5 M pH 8,8 y 0,5 M pH 6,8, de *buffer* de corrida con TRIS 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1 %P/V y pH 8,3, del colorante conteniendo 0,1 %P/V de azul brillante de Coomassie R250, 45 %V/V de metanol y 10 %V/V de ácido acético.

El gel de corrida estuvo compuesto de acrilamida al 11,68 %V/V y bis-acrilamida 0,32 %V/V solubilizadas en *buffer* TRIS-HCl 1,5 M pH 8,8, conteniendo SDS 0,1 %V/V. El gel de concentración contenía acrilamida al 3,8 %V/V, bis-acrilamida 0,2 %V/V solubilizadas en *buffer* TRIS-HCl 0,5 M pH 6,8, conteniendo SDS 0,1 %V/V. Los geles mencionados se prepararon en presencia de urea 6 M. La reacción de polimerización fue iniciada por el agregado de 50 µL de APS (preparado en el momento) y 5 µL de TEMED.

El *buffer* de siembra, para la preparación de muestras para electroforesis estaba constituido por TRIS-HCl 0,06 M pH 6,8; SDS 2 %V/V, glicerol 20 %V/V, urea 6M, azul brillante de Coomassie R250 0,01 %V/V y β-ME al 1 %V/V.

Las muestras conteniendo una concentración de proteína entre $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ y 1 g.L^{-1} se disolvieron en 1 mL de *buffer* de siembra.

2.1.2.5.2. Tricina-SDS-PAGE

Para la preparación de *buffer* de muestra (no reductor) se prepararon: *buffer* B (SDS 12 %P/V, glicerol 30 %P/V, azul brillante de Coomassie R250 0,05 % y TRIS-HCl 0,15 M), *buffer* B/4 (*buffer* B diluido con 3 volúmenes de agua) y *buffer* D (*buffer* B sin glicerol). El *buffer* gel estuvo compuesto por TRIS 3 M, HCl 1 M, SDS 0,3 % a pH 8,45. El *buffer* ánodo estuvo compuesto por TRIS 1 M, HCl 0,225 M a pH 8,9. El *buffer* cátodo estuvo compuesto por TRIS 1 M, tricina 1 M, SDS 1% a pH $\sim 8,25$ (pH no corregido). La solución *stock* AB-3 estuvo compuesta por acrilamida 48 %P/V y bis-acrilamida 1,5 %P/V. La solución *stock* AB-6 estuvo compuesta por acrilamida 46,5 %P/V y bis-acrilamida 3 %P/V.

El gel de separación (16%/6M urea) se preparó a partir de 5 mL de solución *stock* AB-6, 5 mL de *buffer* gel (3x) y 5,4 g de urea para obtener un volumen final de 15 mL. La polimerización del mismo se inició por el agregado de 50 μL APS 10 % P/V y 5 μL de TEMED.

El gel espaciador (10 %) se preparó a partir de 3 mL de solución *stock* AB-3, 5 mL de *buffer* gel (3x) y 1,5 g de glicerol para obtener un volumen final de 15 mL. La polimerización del mismo se inició por el agregado de 75 μL de APS 10 %P/V y 8 μL de TEMED. El gel de concentración (4 %) se preparó a partir de 0,5 mL de solución *stock* AB-3 y 1,5 mL de *buffer* gel (3x) para obtener un volumen final de 6 mL. La polimerización del mismo se inició por el agregado de 45 μL de APS 10 % P/V y 8 μL de TEMED.

2.1.3. Equipos utilizados

2.1.3.1. Mediciones espectroscópicas

Las medidas espectrofotométricas en el espectro ultravioleta (UV) y visible (V) se realizaron en los espectrofotómetros Spekol 1200 y Jasco V-550, ambos equipados con portacubetas termostatizables. Las medidas consistieron en la obtención de espectros de absorción, lecturas de absorbancia (A) y turbidez (τ) a una longitud de onda (λ) fija, y curvas cinéticas a λ fija y variable.

Las medidas de τ se efectuaron como medidas de A en un rango de 450 a 650 nm, en donde no se produce absorción por parte de cromóforos proteicos, sin necesidad de corregir dichas mediciones por el efecto de la luz dispersada a pequeños ángulos, debido a que los

tamaños de las partículas estudiadas son comparables con la λ utilizada, lo que implica diferencias mínimas entre las medidas de τ y A [92].

Las medidas espectrofluorimétricas se hicieron en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman Series 2, equipado con portacelda termostatizable. Las medidas consistieron en la obtención de espectros de excitación y emisión de la fluorescencia y lecturas de intensidad relativa de la fluorescencia (IF) a una dada longitud de onda de excitación (λ_{exc}).

Las medidas del tamaño medio de partículas y la distribución de tamaño de las mismas fueron realizadas a través de medidas de dispersión dinámica de la luz (DLS) y de difracción láser. Los ensayos de DLS fueron realizados en un equipo Brookhaven Modelo 9863 termostatizable, con láser He-Ne como fuente de luz coherente y poder máximo de 15mV, a una λ de 632,8nm. La intensidad de la luz dispersada fue medida a un ángulo de 90°. Los diámetros hidrodinámicos fueron calculados utilizando el software BI9000AT.

2.1.3.2. Mediciones potenciométricas

Las medidas de pH se realizaron utilizando un pH-metro digital Horiba D24, equipado con un electrodo de membrana de vidrio selectivo a protones combinado con un electrodo de referencia de calomel saturado.

2.1.3.3. Mediciones reológicas

Las determinaciones de los módulos de elasticidad o de almacenamiento (G') y viscoso o de pérdida (G'') se efectuaron en un reómetro de tensión controlada ARG2, de Texas Instruments (Brookfield Engineering Laboratories, E.U.A).

2.1.3.4. Microscopía

2.1.3.4.1. Microscopio óptico

Para la obtención de imágenes digitales por microscopía óptica convencional se utilizó un microscopio invertido (Union Optical, Japón) al cual se le acopló una cámara fotográfica digital (Canon Powershot A640) para la obtención de imágenes, las cuales fueron digitalmente almacenadas para su posterior análisis. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo de 100x, *zoom* 4x y adaptador de la cámara para microscopio de 52 mm.

2.1.3.4.2. Microscopio confocal

Para la obtención de imágenes digitales por microscopía confocal se utilizó un microscopio confocal invertido NIKON TE2000E (Nikon Instruments Inc., USA) con un objetivo de 40x, *zoom* de 2x, láser de excitación He-Ne 543 nm y banda de emisión de 605-675 nm. Las imágenes adquiridas fueron almacenadas en formato *TIFF* para su posterior análisis.

2.1.3.5. Equipos de apoyo

Se utilizaron baños termostáticos, baños de circulación de agua, bombas de vacío, centrífugas, agitadores magnéticos Jonomex y Hanna HI 190 M, cronómetros digitales, equipo para electroforesis Mini-PROTEAN 3 Cell (BIO-RAD, Estados Unidos), rectificador y fuente de poder estabilizada Chemar S.A.C.I.F. CHF 1.4, micropipetas Oxford, BOECO 921, V3-series (High Tech. Lab.), Wheaton 851303 y Hamilton 171 ORN, viscosímetro de Ostwald y densímetro digital Anton Paar GmbH.

2.1.4. Programas de procesamiento de datos utilizados

Se desarrollaron programas específicos en lenguaje de programación Python para procesar las imágenes digitales, desarrollado por el Dr. Horacio Castellini [93]. Se usó el programa informático de análisis de imágenes ImageJ para la obtención del diámetro medio de los poros y de la distribución de tamaño de los mismos a partir de las imágenes obtenidas por microscopía. Se usaron los programas informáticos OriginPro 8.0, SigmaPlot 10.0, Minitab 16 y R 2.11.0 para los procesamientos estadísticos de los datos obtenidos. Para el análisis de las densidades de los *píxels* de las bandas proteicas digitalizadas de los geles de electroforesis se utilizó un programa informático especialmente diseñado para este propósito (X-GEL).

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Determinación de proteínas por el método de Lowry

La concentración de WPI y péptidos producto de hidrólisis fue determinada mediante el método de Lowry-Peterson que consiste en una modificación del método colorimétrico de Lowry original [94].

Técnica operatoria

- Solución A: Na_2CO_3 20 g.L^{-1} , NaOH 4 g.L^{-1} , $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 1 g.L^{-1} (tartrato de sodio y potasio)
- Solución B: CuSO_4 5 g.L^{-1}
- Solución C: reactivo de Folin-Ciocalteu diluido al medio con agua destilada.

Se prepararon las soluciones A, B y C y, en el momento de su uso se preparó una solución alcalina (solución D) de la siguiente manera: se mezclaron 50 mL de solución A con 1 mL de solución B.

Se colocaron 100 μL de las muestras en 2,5 mL de solución D. Para el blanco se utilizó agua destilada. Se incubaron las mismas a 37 °C durante 10 min y a continuación se les agregó 300 μL de solución C. Se mantuvieron las mezclas durante 30 min en oscuridad y luego se determinó la A de las mismas a 750 nm.

Para la confección de la curva patrón se preparó una solución de albúmina sérica bovina de concentración 1 g.L^{-1} y se realizaron las siguientes diluciones (Tabla 2.1):

Tabla 2.1: Soluciones utilizadas para la confección de la curva patrón Lowry

	Sol. D (mL)	Agua (μL)	Sol. Albúmina	Conc. final (g.L^{-1})
blanco	2,5	100	0	0
1	2,5	90	10	0,1
2	2,5	80	20	0,2
3	2,5	70	30	0,3
4	2,5	60	40	0,4
5	2,5	50	50	0,5
6	2,5	40	60	0,6
7	2,5	30	70	0,7
8	2,5	20	80	0,8
9	2,5	10	90	0,9
10	2,5	0	100	1,0

Se repitieron los mismos procedimientos de incubación y se determinó la A a 750 nm. Se obtuvo una relación lineal entre los valores de A obtenidos y la concentración de albúmina sérica bovina (valor del coeficiente de correlación lineal obtenido: 0,982).

2.2.2. Determinación de la concentración de CN utilizando el método de Kuaye

La concentración de CN (C_{CN}) en las distintas muestras de NaCAS y MC fue determinada por el método espectrofotométrico propuesto por Kuaye el cual se basa en la modificación del espectro del aminoácido tirosina a altas λ de la región UV, en un medio alcalino fuerte (pH = 13) [95].

En la región entre 248 y 256 nm, la A es una función lineal de la λ y la pendiente es directamente proporcional a la concentración proteica según:

$$C_{CN} = (A^{248}_m - A^{256}_m) \cdot (\text{factor dil.})_m / (A^{248}_t - A^{256}_t) \cdot (\text{factor dil.})_t \quad 2.1$$

donde los supraíndices representan las λ a las cuales se mide la A y los subíndices señalan si se trata de la muestra (m) o del testigo (t). Esta formulación es válida para los casos donde la relación lípidos/proteínas $\leq 0,05$. El testigo debe contener 1 g.L⁻¹ de proteínas en total y respetar las proporciones de los constituyentes de la muestra a medir.

Técnica operatoria:

Se realizaron las siguientes diluciones en NaOH 0,25 N: 1/100 V/V para las muestras y 1/5 V/V para un testigo (solución NaCAS comercial 1 g.L⁻¹, preparado en el momento a T ambiente). Se registró la A de dichas diluciones a 248 y 256 nm y luego se aplicó la relación mostrada en la Ecuación 2.1.

2.2.3. Evaluación del tamaño medio de las partículas de NaCAS por medidas de τ

Los posibles cambios de tamaño y/o grado de compactación de las partículas fueron estudiados basándose en la dependencia de la τ con la λ en el rango de 450-650 nm, rango de λ en donde no hay absorción de los grupos cromóforos de la proteína.

La relación entre el tamaño de una partícula y las características de la luz que dispersa se encuentra bien descrita en la bibliografía para partículas de forma simple [96]. Por ejemplo, para partículas esféricas monodispersas de peso molecular MM, concentración c y con índice de refracción cercano al del solvente, la τ está dada por:

$$\tau = H.c.MM.Q \text{ siendo } H = \frac{32.\pi^2.n_0^2.\left(\frac{\partial n_1}{\partial c}\right)^2}{3.N.\lambda^4} \quad 2.2$$

donde n_0 y n_1 son los índices de refracción del solvente puro y de la solución respectivamente, N es el número de Avogadro, $\partial n_1/\partial c$ es el incremento específico del índice de refracción y la función de dispersión Q resulta de las interferencias internas de la luz dispersada por las partículas a todos los ángulos θ y se incorpora a la expresión cuando las partículas poseen un tamaño mayor que la λ incidente. Esta función Q , que depende de la forma de las partículas, se puede definir como:

$$Q = \frac{3}{8} \int_0^\pi P(q, R)(1 + \cos^2 \theta) \text{sen}\theta d\theta \quad 2.3$$

en la que θ es el ángulo de dispersión de la luz y $P(q, R)$ es un factor de forma donde q es el vector de onda y R el radio de la partícula [97]. Los resultados de estudios de simulación por computadoras utilizando diferentes modelos de agregación han permitido definir la estructura de los agregados coloidales en términos del concepto de dimensión fractal [98-99]. Para un objeto fractal, Q se ve modificada como sigue:

$$Q = \frac{3}{8} \int_0^\pi P(q, R)S(q)(1 + \cos^2 \theta) \text{sen}\theta d\theta \quad 2.4$$

siendo $S(q)$ un factor de estructura que describe el arreglo espacial de los elementos de dispersión o monómeros dentro del agregado [100].

De la Ecuación 2.2 se puede obtener la derivada:

$$\frac{\partial \log \tau}{\partial \log \lambda} = \frac{\partial \log Q}{\partial \log \lambda} + 2 \cdot \frac{\partial \log \left(n \cdot \frac{\partial n}{\partial c} \right)}{\partial \log \lambda} - 4 = \beta + \gamma - 4 \quad 2.5$$

El parámetro β está por lo tanto relacionado en forma directa con el tamaño y grado de compactación de las partículas en suspensión.

Teniendo en cuenta que las soluciones de proteínas a estudiar no son muestras monodispersas, la τ será función del peso molecular promedio en peso (\overline{M}_p) y del factor de dispersión promedio z (Q_z) que depende de la distribución de tamaños promedio:

$$\tau = H \cdot \overline{M}_p \cdot Q_z \quad 2.6$$

A partir de esta ecuación se puede demostrar la relación directa entre β y el tamaño promedio en peso de las partículas en solución [101].

Aceptando un valor de -0,2 para γ , que es el estimado para proteínas en un rango de λ de 400 a 800 nm, se puede calcular el valor de β a partir de la pendiente de gráficos lineales de $\log \tau$ vs. $\log \lambda$ midiendo la τ en el citado rango de λ a intervalos frecuentes durante el tiempo necesario para alcanzar un máximo de τ durante la agregación del sistema [97]:

$$\beta = 4,2 + \frac{\partial \log \tau}{\partial \log \lambda} = 4,2 + \alpha \quad 2.7$$

Técnica operatoria:

El valor de β se obtuvo teniendo en cuenta que [102]:

$$\tau = b^{-1} \ln \frac{I_0}{I} \quad 2.8$$

donde I_0 e I son las intensidades de luz incidente y transmitida respectivamente y b es el camino óptico; y dado que la A se define como:

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad 2.9$$

la τ queda expresada como:

$$\tau = 2,303 \cdot A \cdot b^{-1} \quad 2.10$$

Aplicando log:

$$\log \tau = \log(2,303) + \log A - \log b \quad 2.11$$

y si se deriva con respecto a λ :

$$\frac{\partial \log \tau}{\partial \log \lambda} = \frac{\partial \log A}{\partial \log \lambda} = \alpha \quad 2.12$$

De esta manera, el valor de $\partial \log \tau / \partial \log \lambda$ es la pendiente de un gráfico lineal de $\log A$ vs. $\log \lambda$ y a partir de él se obtiene β según la Ecuación 2.7.

Para obtener dichas mediciones se colocaron alícuotas de las distintas muestras en cubetas rectangulares de 1 cm de paso óptico y 3 mL de volumen y se midió la A entre 450 y 650 nm en un espectrofotómetro con portaceldas termostatizable.

Con los valores de β y de τ a 600 nm (medida como A 600 nm) se evaluó el estado de las suspensiones coloidales o de los agregados formados por la floculación y/o agregación de las partículas durante el proceso de gelificación ácida inducida por GDL o agregación post enzimática, y los posibles cambios de estos procesos frente a las distintas condiciones de trabajo.

A modo de ejemplo, la Figura 2.1 presenta un gráfico lineal de $\log \tau$ vs. $\log \lambda$ de los numerosos realizados en el presente trabajo.

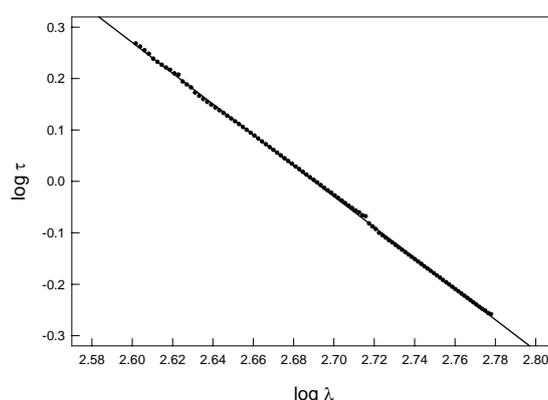


Figura 2.1. Ejemplo de la obtención de β . $\alpha = \partial \log \tau / \partial \log \lambda = -2,997$; $r^2 = 0,999$; $\beta = 1,203$

Los métodos de DLS, como el de difracción láser, empleados para estudiar la distribución de tamaño de las partículas, han alcanzado amplia difusión en la actualidad merced a la posibilidad de utilizar fuentes luminosas láser, monocromáticas, coherentes y de gran energía, lo que aumenta de forma notable la posibilidad de detectar la radiación dispersada [103]. Para corroborar la relación entre β y el tamaño medio de las partículas, se realizaron medidas de DLS.

2.2.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

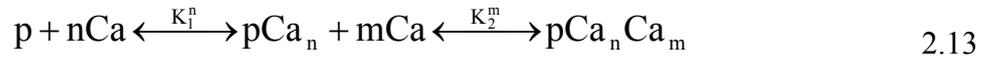
La composición proteica de las diferentes muestras fue analizado por SDS-PAGE, usando un sistema de gel vertical, de acuerdo al método de Laemmli [104]. Se realizaron además tricina-SDS-PAGE para evaluar la presencia de proteínas de peso entre 2 y 30 kDa [105-106].

Técnica operatoria

Se sembraron cantidades adecuadas de proteína disueltas en *buffer* de siembra de modo de obtener 10-20 μg de proteína por cada 20 μL de muestra. El tiempo de corrida fue de aproximadamente 45 min, a 25 $^{\circ}\text{C}$ y con intensidad de 12 mA para el gel de separación y de 25 mA para el gel de corrida. Las proteínas fueron teñidas con una solución colorante de Coomassie brilliant blue R250, y decoloradas con metanol al 10 %V/V y una solución decolorante de ácido acético al 10 %V/V. La intensidad relativa de las bandas coloreadas fue determinada por escaneado digital de las fotografías de los geles y posterior análisis de las densidades de los *píxeles* de las bandas proteicas digitalizadas, incluyendo la deconvolución del patrón de curvas escaneado, cuando fue necesario. Las bandas proteicas fueron identificadas usando un patrón de pesos moleculares (Sigma-Aldrich Argentina).

2.2.5. Determinación de la Estabilidad Coloidal

Durante la formación de agregados de caseinato de calcio (ACC) el modelo asume la existencia de dos clases de sitios de unión para el catión, el primero da lugar a la formación de complejos insolubles (precipitación o *salting-out*), mientras que la unión al segundo tipo de sitios provocaría la redisolución de dichos complejos (redisolución o *salting-in*). Los equilibrios involucrados se pueden formular como:



donde p es la CN no unida al Ca^{2+} , n y m los números de moles de Ca^{2+} unidos a los dos tipos de sitios ($p\text{Ca}_n$ y $p\text{Ca}_n\text{Ca}_m$) por mol de proteína y K_1 y K_2 son las constantes aparentes de fijación por sitio. K_1 es la constante de equilibrio del proceso de precipitación o *salting-out* y K_2 corresponde al segundo proceso de redisolución o *salting-in* [16].

La cantidad de proteína libre se denomina solubilidad aparente de la proteína (S_{ap}). S_0 , S_1 y S_2 son definidas como solubilidades intrínsecas de p, $p\text{Ca}_n$ y $p\text{Ca}_n\text{Ca}_m$, respectivamente. El modelo para S_{ap} en este caso adopta la forma:

$$S_{ap} = f_p S_0 + f_{p\text{Ca}_n} S_1 + f_{p\text{Ca}_n\text{Ca}_m} S_2 \quad 2.14$$

donde S_{ap} da una medida de la estabilidad coloidal a una dada concentración total de sal de calcio y f_i son los componentes fraccionales de especies *i* referidos al equilibrio señalado.

La incorporación de las constantes de equilibrio a la Ecuación 2.14 conduce a:

$$S_{ap} = \frac{S_0 [p]}{[p] + K_1^n [p][Ca^{2+}]^n} + \frac{S_1 K_1^n [p][Ca^{2+}]^n}{[p] + K_1^n [p][Ca^{2+}]^n} + \frac{(S_2 - S_1) K_2^m [p][Ca^{2+}]^m}{[p] + K_2^m [p][Ca^{2+}]^m} \quad 2.15$$

donde $[p]$ es la concentración de proteína no unida y $[Ca^{2+}]$ es la concentración de Ca^{2+} libre. Cancelando los factores comunes se obtiene:

$$S_{ap} = \frac{S_0}{1 + K_1^n [Ca^{2+}]^n} + \frac{S_1 K_1^n [Ca^{2+}]^n}{1 + K_1^n [Ca^{2+}]^n} + \frac{(S_2 - S_1) K_2^m [Ca^{2+}]^m}{1 + K_2^m [Ca^{2+}]^m} \quad 2.16$$

Debería remarcarse que la expresión anterior es válida para la secuencia de la fijación en la que $K_1 > K_2$ y los n sitios se saturan antes que el Ca^{2+} se fije a los m sitios de la proteína y para más simplicidad n y m no interactúan entre sí. Cuando la concentración total de proteína es pequeña en relación a la concentración total de Ca^{2+} , esta última puede usarse en la expresión en lugar de la concentración libre de Ca^{2+} . La concentración de calcio total, $[Ca^{2+}]_T$ es la suma de $[Ca^{2+}]$ y la concentración de calcio ligada a las especies pCa_n y pCa_nCa_m y está dada por la siguiente expresión:

$$[Ca^{2+}]_T = [Ca^{2+}] \cdot \left(1 + \frac{nK_1^n M_T [Ca^{2+}]^{n-1}}{1 + K_1^n [Ca^{2+}]^n} + \frac{mK_2^m M_T [Ca^{2+}]^{m-1}}{1 + K_2^m [Ca^{2+}]^m} \right) \quad 2.17$$

siendo M_T la concentración total de CN. De la Ecuación 2.17 puede verse con facilidad que $[Ca^{2+}]_T = [Ca^{2+}]$ cuando la concentración de M_T es relativamente menor que $[Ca^{2+}]$ [16]. Para las experiencias realizadas se asume esta aproximación como razonable dado el rango de $[Ca^{2+}]_T$ que utilizamos y la masa molar de las CN.

Si se trabaja en un rango de concentraciones de Ca^{2+} en el que predomina el primer equilibrio y además $K_1 > K_2$ podemos despreciar el último término y la Ecuación 2.16 se reduce a:

$$S_{ap} = \frac{S_0 + S_1 K_1^n [Ca^{2+}]_T^n}{1 + K_1^n [Ca^{2+}]_T^n} \quad 2.18$$

Los perfiles de solubilidad fueron analizados mediante regresión no lineal fijándose el valor de n y calculando el valor de K_1 y S_1 , los cuales fueron testados por comparación de los valores residuales calculados como la suma de los cuadrados de las diferencias entre los datos experimentales y el correspondiente a la curva teórica.

Alvarez (2000, 2007) incorporó un termino adicional a la expresión 2.18 para resolver en mayor detalle la aparición de un “hombro” en la región de *salting-out* de los perfiles de solubilidad [107-108]. Considerando dicho término, la Ecuación 2.18 se transforma en la siguiente expresión:

$$S_{ap} = \frac{S_0 + S_1 K_1^n [Ca^{2+}]_T^n}{1 + K_1^n [Ca^{2+}]_T^n} + \frac{(S'_1 - S_1) K_1^{n'} [Ca^{2+}]_T^{n'}}{1 + K_1^{n'} [Ca^{2+}]_T^{n'}} \quad 2.19$$

donde se incorporan nuevos parámetros S'_1 , K'_1 y n' de igual significado a sus homólogos S_1 , K_1 y n , pero haciendo referencia a una segunda etapa de *salting-out*.

Técnica operatoria:

Para NaCAS bovino y ovino, se prepararon mezclas a T ambiente, conteniendo las siguientes concentraciones finales:

- NaCAS 5 g.L⁻¹, 10 g.L⁻¹ o 15 g.L⁻¹
- buffer Imidazol 0,01 M pH 6,8
- CaCl₂ 0,001-0,04 M de Ca²⁺.

Se homogeneizaron los sistemas por inversión suave, 3 veces. Se incubaron los tubos de centrífuga 1 h a T ambiente para que el sistema alcance el equilibrio. Luego, se centrifugaron a 1.500xg durante 15 min [109]. Se descartó el precipitado (agregados insolubles) y en los sobrenadantes (ACC) se determinaron los valores de S_{ap} , τ y β .

Los valores de S_{ap} se obtuvieron utilizando el método de Kuaye y, junto con los valores de $[Ca^{2+}]_T$, fueron analizados por un ajuste no-lineal mediante el algoritmo de Levenberg-Marquardt [110], utilizando la Ecuación 2.19.

2.2.6. Mediciones viscosimétricas de los ACC

2.2.6.1. Determinación de la viscosidad relativa

La determinación de la viscosidad se realizó utilizando un viscosímetro de Ostwald. Según la ley de Poiseville:

$$\eta = \frac{\pi \cdot h \cdot g \cdot \rho \cdot r^4 \cdot t_e}{8 \cdot L \cdot V} \quad 2.20$$

donde η es la viscosidad de la solución, g es la aceleración de la gravedad, h es la altura media de la columna de líquido, ρ es la densidad de la solución, r es el radio del capilar, t_e es el tiempo que tarda en pasar el líquido desde un enrase A a uno B (tiempo de escurrimiento), L es la longitud del capilar y V es el volumen del líquido.

Para el solvente puro, que en este caso fue agua destilada, resulta:

$$\eta_0 = \frac{\pi \cdot h \cdot g \cdot \rho_0 \cdot r^4 \cdot t_0}{8 \cdot L \cdot V} \quad 2.21$$

Dividiendo miembro a miembro 2.20 y 2.21, se obtiene:

$$\eta_r = \frac{t_{sol} \cdot \rho_{sol}}{t_0 \cdot \rho_0} \quad 2.22$$

siendo ρ_{sol} la densidad de la solución, ρ_0 la densidad del agua, t_{sol} y t_0 son los tiempos de escurrimiento de la muestra y el agua respectivamente y η_r la viscosidad relativa.

Técnica operatoria:

Se determinó la variación de η_r producida por el incremento de la concentración de proteína a relaciones fijas de concentración de ión Ca^{2+} /concentración de CAS (Ca^{2+} :CAS) utilizando un viscosímetro de Ostwald termostatzado, el cual puede ser usado satisfactoriamente para determinaciones de viscosidad en líquidos Newtonianos. El viscosímetro fue situado en un baño de agua controlado termostáticamente a la T de $(30,00 \pm 0,05) ^\circ C$.

La relación de Ca^{2+} :CAS se mantuvo siempre en el rango en el cual no se observó precipitación de proteína (0 a $0,5 \cdot 10^{-3}$ M.L.g⁻¹). Se usó el mismo viscosímetro para todas las determinaciones y se montó de manera que siempre ocupó la misma posición en el baño. Los tiempos de escurrimientos fueron como máximo de 3 min, en este tiempo se puede considerar el equilibrio de los agregados en solución. De la misma manera se determinó la viscosidad del solvente.

2.2.6.2. Determinación de la viscosidad intrínseca

La viscosidad intrínseca ($[\eta]$) está definida por la siguiente ecuación:

$$\lim_{c_2 \rightarrow 0} \frac{(\eta / \eta_0) - 1}{c_2} = [\eta] \quad 2.23$$

donde c_2 es la concentración de la proteína en g.mL^{-1} , y η y η_0 son las viscosidades de las soluciones y del solvente, respectivamente. La $[\eta]$ depende idealmente sólo de la forma y el grado de compactación de las moléculas individuales en solución y es independiente de la concentración.

Técnica operatoria:

Las viscosidades de soluciones de concentraciones crecientes de suspensiones de ACC a diferentes relaciones fijas de $\text{Ca}^{2+}:\text{CAS}$ fueron medidas como se indicó en la Sección 2.2.6.1.

La $[\eta]$ se determinó por mediciones de η de una serie de soluciones diluidas (0,006 a 0,014 g.mL^{-1}), graficando $((\eta/\eta_0)-1)/c_2$ en función de la concentración c_2 y extrapolando a concentración cero [111].

2.2.6.3. Determinación del volumen específico parcial y del factor de forma

El volumen específico parcial (\bar{v}_2) de un componente de una solución está definido por la siguiente ecuación:

$$\bar{v}_2 = \frac{\partial V}{\partial m_2} \quad 2.24$$

donde V es el volumen de la solución y m_2 es la masa del componente considerado.

Para macromoléculas que usualmente interaccionan con el solvente, \bar{v}_2 depende de la concentración de la solución. Debido a que cambios en la concentración de la solución se relacionarán con cambios en su densidad (ρ), es posible expresar \bar{v}_2 a cualquier concentración en términos de la rapidez del cambio de ρ , $\partial\rho/\partial c_2$. Usando este parámetro y la concentración c_2 , se puede escribir la siguiente ecuación:

$$\bar{v}_2 = \frac{1 - (\partial\rho / \partial c_2)}{\rho - c_2 \cdot (\partial\rho / \partial c_2)} \quad 2.25$$

donde el término en el numerador puede ser calculado de un gráfico de ρ vs. c_2 , y el denominador es la densidad a concentración cero, ρ_0 . Entonces, este tipo de gráfico permite calcular \bar{v}_2 a diferentes concentraciones.

Cuando estos gráficos son lineales, \bar{v}_2 puede ser considerado como independiente de la concentración, y puede ser determinado por la siguiente ecuación:

$$\bar{v}_2 = \left(\frac{1}{\rho_0} \right) \cdot \left(1 - \frac{\Delta\rho}{c_2} \right) \quad 2.26$$

donde $\Delta\rho/c_2$ es la pendiente de la recta obtenida del ajuste de los datos experimentales.

La $[\eta]$ y \bar{v}_2 están relacionados por la siguiente ecuación:

$$[\eta] = v \cdot \bar{v}_2 \quad 2.27$$

donde v es el factor de forma o Simha, directamente relacionado a la conformación de la macromolécula [112].

Técnica operatoria:

Se midieron las ρ de las suspensiones de los ACC a diferentes relaciones de $\text{Ca}^{2+}:\text{CAS}$, pH 6,8 y 30 °C. Luego, los valores de ρ se graficaron en función de la concentración.

Estos gráficos fueron lineales en el rango de concentración de proteína estudiado (0,006 a 0,014 g.mL⁻¹), luego \bar{v}_2 se calculó a partir de la Ecuación 2.26. Con estos valores se calculó el factor de forma v , según la Ecuación 2.27.

2.2.7. Estudio espectrofluorimétrico

2.2.7.1. Estudio de los cambios estructurales del NaCAS

Se registraron espectros de excitación y de emisión de la fluorescencia intrínseca proteica, con el objeto de detectar corrimientos de las bandas espectrales y/o cambios en la IF frente a la presencia de distintos cosolutos. Las longitudes de onda de excitación (λ_{exc}) y emisión (λ_{em}), y el rango de concentración en el cual el efecto de filtro interno resultó despreciable, fueron determinadas para los sistemas bajo estudio.

Técnica operatoria:

Las muestras (3 mL) para las determinaciones espectrales o las medidas de IF fueron transferidas a cubetas de fluorescencia de cuarzo de 1 cm de paso óptico y éstas colocadas en un portacubetas termostatizable capaz de mantener la T de trabajo deseada. Se registraron los valores de IF dentro del rango 300–400 nm, a 35 °C, utilizando como λ_{exc} 286 nm para NaCAS y sus hidrolizados y λ_{exc} 298 nm para WPI y sus hidrolizados.

2.2.7.2. Determinación de la hidrofobicidad superficial

La hidrofobicidad superficial (S_H) fue estimada de acuerdo al método de Kato y Nakai [113-114], utilizando ANS como marcador fluorescente hidrofóbico.

Técnica operatoria:

Previamente, se registraron espectros de excitación y emisión de fluorescencia del ANS, el NaCAS y de la mezcla de los anteriores, para determinar las λ_{exc} y λ_{em} .

La IF de las muestras conteniendo 3 mL de ANS 0,04 mM y consecutivos agregados de NaCAS 0,001 g.mL⁻¹ (IF_b), como también la de la proteína sola en el correspondiente solvente a la misma concentración (IF_p), fueron medidos, usando una λ_{exc} y λ_{em} de 397 y 480 nm respectivamente para CAS bovino y 396 y 474 nm respectivamente para CAS ovino, a temperatura constante (25 °C para CAS bovino y 35 °C para CAS ovino). La IF neta (ΔF) fue calculada como la diferencia entre IF_b e IF_p, y la S_H fue determinada como la pendiente inicial de la curva obtenida al graficar ΔF versus concentración de proteína en g.mL⁻¹.

2.2.8. Estudio de la agregación de partículas de NaCAS o WPI por acidificación inducida por GDL

Dependiendo de la concentración y T, la hidrólisis de la GDL en ácido glucónico puede promover una reducción lenta del pH de soluciones proteicas [115]. Cuando el pH disminuye se produce un aumento de las interacciones proteína-proteína, debido al descenso de la carga neta en el punto isoeléctrico de las mismas.

Se evaluó el proceso de agregación ácida de hidrolizados de NaCAS o WPI obtenidos a partir de los *pooles* enzimáticos P7 o P45 como así también de mezclas de los mismos con sus proteínas de origen. El proceso se evaluó por medidas turbidimétricas, que permitieron monitorear el cambio de tamaño de las partículas en suspensión, basándose en la dependencia de la τ con la λ .

Técnica operatoria:

La cinética de agregación ácida fue iniciada por adición de GDL sobre 3 mL de las muestras, luego las mismas fueron transferidas a cubetas de 1 cm de camino óptico y colocadas en un portacubetas termostatzado a 35 °C.

La cantidad de GDL utilizada fue la necesaria para obtener una determinada relación proteína:GDL (R) según la siguiente ecuación:

$$R = \frac{C_{\text{GDL}}}{C_{\text{P}}} \quad 2.28$$

donde C_{GDL} es la concentración de GDL expresada en %P/P y C_{P} es la concentración de las muestras evaluadas, expresada en %P/P.

Se prepararon muestras conteniendo hidrolizados de NaCAS ovino por acción de PEP7 (0,35 %P/P, R=1); de PEP45 (0,35 %P/P, R=1,5); de NaCAS bovino por acción de PEP7 (0,5 %P/P, R=0,5) y de WPI por acción de PEP7 (0,125 %P/P, R=1,5). Se evualuó además la mezclas de los hidrolizados con sus proteínas de origen: hidrolizados NaCAS ovino (acción de PEP7):NaCAS ovino (0,125 %P/P:0,5 %P/P, R=1); hidrolizados NaCAS ovino (acción de PEPP45):NaCAS ovino (0,125 %P/P:0,5 %P/P, R=2); hidrolizados NaCAS bovino (acción de PEPP7):NaCAS bovino (0,125 %P/P:0,5 %P/P, R=0,5); hidrolizados WPI (acción de PEPP7):WPI (0,125 %P/P:0,5 %P/P, R=1,5) y hidrolizados WPI (acción de PEPP45):WPI (0,125 %P/P : 0,5 %P/P, R=0,5)

Una vez adicionada la GDL, la mezcla se agitó suavemente durante 5 s con un agitador de Teflón y se midió la A de la suspensión dentro del rango 450–650 nm, donde no hay absorción de grupos cromóforos proteicos, hasta que se alcanzó un valor máximo y constante de A. Simultáneamente se midió el descenso de pH.

El proceso de agregación fue seguido a través de mediciones del parámetro β . Se determinaron el tiempo y el pH a los cuales comienza la agregación (t_{ag} y pH_{ag}).

En la Figura 2.2 se muestran, a modo de ejemplo, los valores de β graficados en función del tiempo y el pH.

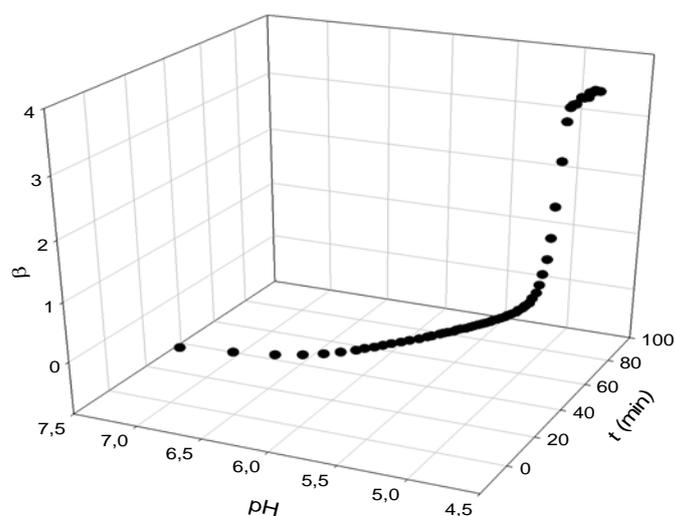


Figura 2.2. Variación de la β a lo largo del tiempo y en función del pH luego de adicionada la GDL.

2.2.9. Evaluación de la gelación ácida

2.2.9.1. Determinación de las propiedades reológicas

Se realizaron ensayos reológicos oscilatorios en un reómetro de tensión y deformación controladas (TA Instruments, modelo AR G2; Estados Unidos). Se utilizó una geometría de tipo cono/plato (diámetro: 40 mm; ángulo cono: 2°; truncación: 55 mm) y se colocó un kit de cubierta trampa de solvente para evitar la contracción de la muestra por evaporación de agua. La T fue controlada con un baño con recirculación conectado al plato Peltier del instrumento. En el reómetro se configuró un procedimiento de adquisición de datos a intervalos de 20 s durante 120 min, fijando los valores de tensión de oscilación en 0,1 Pa y de frecuencia de oscilación en 0,1 Hz. Una vez alcanzado el equilibrio, se realizó un barrido de frecuencia entre 0,1 y 10 Hz.

Se graficaron las curvas de Lissajous a varios tiempos para controlar que las determinaciones del módulo elástico (G'), módulo viscoso (G'') y de la elasticidad compleja fueran siempre obtenidas dentro de la región viscoelástica lineal. Se estimó el tiempo de coagulación (t_c) o de gelificación (t_g) según el caso, como el tiempo en que se igualan G' y G'' conforme a varios estudios que han adoptado este criterio [63, 116]. Además, se registró el máximo valor de G' ($G'_{\text{máx}}$) y G'' ($G''_{\text{máx}}$) alcanzado, con así también el valor de ($\tan \delta$). Las determinaciones fueron realizadas al menos por triplicado.

2.2.9.2. Obtención de las imágenes de los geles ácidos formados

Para la obtención de las imágenes en el microscopio óptico invertido se colocaron un pequeño volumen de cada muestra en placas LAB-TEK II de ocho compartimientos (por triplicado) como se muestra en la Figura 2.3.

El volumen óptimo a utilizar en cada placa se determinó colocando diferentes cantidades de muestra en cada compartimiento (80-120 μL), eligiendo el mínimo volumen que luego de la gelificación formaba la menor película delgada y completa de gel cubriendo la totalidad de la celda, para la realización de las medidas en el microscopio óptico invertido.

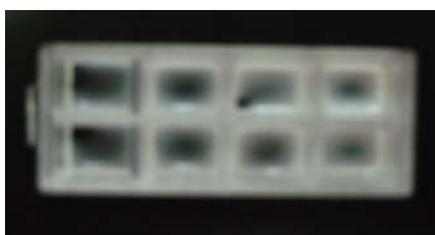


Figura 2.3. Placa LAB-TEK II conteniendo distintas muestras.

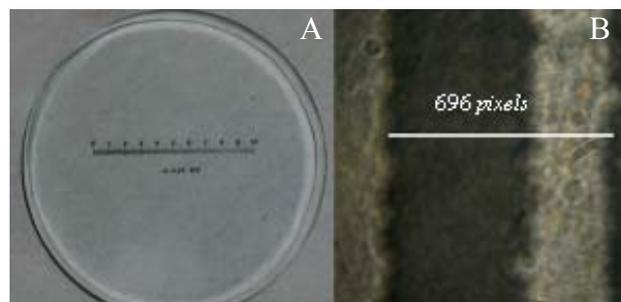


Figura 2.4. En estas fotografías se observa: A) Imagen de la regla utilizada [93]. B) Imagen tomada con un objetivo de 100x, zoom 4x y adaptador para microscopio de 52 mm .

Para determinar a cuántos μm equivale un *pixel* de las imágenes obtenidas, se tomaron fotografías de una regla de 1 cm de longitud que poseía 200 divisiones [93]. En la Figura 2.4.A se muestra la regla utilizada, y en la Figura 2.4.B la imagen obtenida con un aumento de 100x. En esta última se puede visualizar la distancia entre cada división la cual es de 0,05 mm, permitiendo obtener la resolución de las imágenes de los geles proteicos la cual fue:

$$1 \text{ pixel} = (0,0718 \pm 0,0005) \mu\text{m} \quad 2.29$$

$$\text{Resolución} = 13,92 \text{ pixel}/\mu\text{m} \quad 2.30$$

Para la obtención de imágenes en el microscopio confocal, mezclas de NaCAS bovino (3 %P/P) con sus respectivos hidrolizados (0,75 %P/P) obtenidos con el *pool* enzimático P7 a distintos tiempos (t) de acción enzimática fueron teñidas con una solución del marcador fluorescente Rodamina B ($2 \cdot 10^{-3}$ g.L⁻¹). El proceso de gelación ácida fue iniciado mediante la adición de una cantidad adecuada de GDL (R = 0,5) y posteriormente alícuotas de 200 μ L fueron depositadas inmediatamente sobre los compartimentos de placas LAB-TEK II. El proceso de gelación se realizó a 35 °C con humedad controlada. Las imágenes adquiridas se almacenaron en formato *TIFF* para su posterior análisis.

2.2.9.3. Determinación del diámetro medio de los intersticios de los geles ácidos

Se evaluó la microestructura de los geles proteicos mediante el análisis digital de las imágenes obtenidas, determinando el diámetro medio de los intersticios o poros formados durante el proceso de gelación, así como la distribución de tamaños de los mismos.

Técnica operatoria:

Se utilizó el programa informático ImageJ para determinar el diámetro y el área promedio de los poros y la distribución de diámetro de poro. El valor de corte para determinar los *píxeles* pertenecientes al objeto en estudio o que forman parte del fondo de la imagen fue determinado de acuerdo al método propuesto por Pugnaroni et al., el cual se basa en la elección del máximo en una gráfica de número de poros vs. valores de corte [117].

2.2.10. Análisis textural de imágenes

Tal como fuera propuesto por Costa et al. [93], para reducir la complejidad computacional en el análisis de las imágenes de los geles obtenidos, en este trabajo se usaron sólo los 2 estimadores más relevantes utilizados en la literatura [118]. Se supuso que la sucesión de escala de grises, N_i donde el índice i es un nivel de gris, corresponde a un proceso estocástico de medida estacionaria con varianza finita, sobre el cual se usan los siguientes estimadores: la entropía de Shannon (S) y la Uniformidad (U) las que se definen a través de las Ecuaciones 2.31, y 2.32 respectivamente [119].

$$S = -\sum_{i=0}^{L-1} p(N_i) \log_2(p(N_i)) \quad 2.31$$

$$U = \sum_{i=0}^{L-1} p^2(N_i) \quad 2.32$$

donde $\sigma^2(N)$ es la varianza, $p(N_i)$ es la frecuencia estadística muestral normalizada de la escala de grises y L es el máximo nivel de negro.

La varianza es una medida del contraste de los niveles de grises y se puede usar para establecer descriptores de la suavidad relativa. El valor de U es máximo para una imagen en la que todos los niveles de grises son iguales y decrece de ahí en más. El parámetro S es una medida de la variabilidad y toma el valor 0 para una imagen constante.

Técnica operatoria:

Previo al análisis, las imágenes obtenidas en formato numérico de 8 *bits* RGB (rojo, verde, azul) en cada uno de los niveles de color, fueron transformadas a formato YUV (sistema de transmisión digital de televisión) donde se extrajo la escala de grises, Y , por la siguiente transformación:

$$Y = 0,299 \text{ Rojo} + 0,587 \text{ Verde} + 0,114 \text{ Azul} \quad 2.34$$

El código del programa usado para procesar la imagen escrito en Python fue desarrollado por el Dr. Horacio Castellini y fue descrito por Costa, 2011 [93, 120]. En este código se hace uso de la biblioteca de procesamiento de imagen del lenguaje informático, ésta da la imagen en el formato RGB (Rojo, Verde, Azul) el cual es una escala entera de valores que va desde el 0 a 255.

Tomando la parte entera de la Ecuación 2.34 se obtiene la escala de grises buscada para los análisis estadísticos, y se normalizan los valores por medio de la siguiente transformación:

$$N = (L-1) \frac{Y - Y_{\min}}{Y_{\max} - Y_{\min}} \quad 2.35$$

donde L es el máximo nivel de negro, Y_{\min} es el mínimo valor de la escala de grises y Y_{\max} el valor máximo.

2.2.11. Obtención de los *pooles* enzimáticos P7 y P45

Las proteasas fueron producidas por *Bacillus* sp. P7 o por *Bacillus* sp. P45, las bacterias se inocularon en tubos de ensayo con BHI líquida (5 mL) y se dejaron 24 h a 30 °C. Luego, una muestra de 1 mL se traspasó a otro tubo de ensayo con BHI (5 mL) y se volvió a incubar 24 h a 30 °C. Por último, se tomaron 500 µL y se inocularon en un medio agar-BHI que se dejó en estufa por 24 h a 37 °C. Al cumplirse dicho tiempo, se aisló una colonia y se inoculó en un nuevo medio agar-BHI. Seguidamente se puso en estufa por 24 h a 37 °C. Por último, se tomó una colonia aislada y se colocó en un erlemeyer conteniendo 100 mL de medio de cultivo (NaCl 0,5 g L⁻¹, KH₂PO₄ 0,4 g L⁻¹, K₂HPO₄ 0,3 g L⁻¹ y harina de pluma de gallina al 1 %), y se incubó 48 h a 30°C con agitación constante a 180 g en un agitador rotatorio. Posteriormente, se centrifugó durante 15 min a 3.000xg.

El sobrenadante de cultivo fue precipitado con sulfato de amonio al 60% de saturación, se dejó 1 h en agitación y luego 1 h a 4 °C. Posteriormente, se centrifugó 15 min a 10.000xg a 4 °C. El precipitado se resuspendió en la menor cantidad posible de *buffer* TRIS-HCl 0,02 M pH 8. Por último, se realizó una cromatografía líquida en Sephadex G-100® (1 g en 100 mL de *buffer* TRIS-HCl 0,02 M pH 8). A todas las fracciones obtenidas se les midió su actividad proteolítica usando azocaseína como sustrato.

2.2.12. Determinación de la actividad enzimática de PEP7 y PEP45

El sustrato se preparó inmediatamente antes de ser usado, por disolución de 0,01 g de azocaseína en 1 mL de *buffer* TRIS-HCl 0,02 M pH 8. Se incubaron a 37 °C, durante 30 min, 100 µL del *buffer*, 100 µL de la enzima y 100 µL del sustrato. Pasado el tiempo de incubación, se detuvo la reacción con el agregado de 100 µL de TCA 10 % (para el blanco se adicionó TCA previo a la incubación). Se centrifugó la muestra a 10.000xg durante 15 min y se adicionó 200 µL de NaOH 1,8 N al sobrenadante. La actividad proteolítica se midió como A a 420 nm en espectrofotómetro y se definió una unidad de actividad enzimática (U_{AE}) como la cantidad de proteasa que causó un aumento de 0,1 unidades en la A en las condiciones del ensayo. Las fracciones que mostraron actividad proteolítica fueron mezcladas formando un pool enzimático que se denominó PEP7 o PEP45 según corresponda.

2.2.13. Determinación de la actividad coagulante de PEP7 y PEP45

La actividad coagulante de las MC se determinó basándose en el método propuesto por Arima (1970) [121], con ligeras modificaciones, el cual se basa en la evaluación visual de la aparición de los primeros coágulos.

Técnica operatoria:

Se reconstituyeron las MC mediante la suspensión de 10 g de leche en polvo descremada en 100 mL de una solución de 10 mM de CaCl₂ al pH a evaluar, se midió la concentración de CN y las suspensiones se almacenaron durante 24 h previo a su utilización. Posteriormente, se adicionó 0,1 mL de PEP7 (7 U_{AE}) o PEP45 (7 U_{AE}) a 2 mL de la suspensión antes mencionada y se incubó el sistema a 34, 44 o 55 °C. Se registró el tiempo transcurrido (t_{tr}) desde que se adicionó el coagulante hasta que ocurrió la coagulación de las MC como el tiempo de coagulación. Se definió la unidad de actividad coagulante de las MC (U_{ACM}) como la cantidad de enzima presente en 1 mL necesaria para coagular 1 mL de MC en 2.400 s.

$$U_{ACM} = \frac{2.400}{t_{tr}} \cdot \frac{V_{CM}}{V_E} \quad 2.36$$

donde V_{MC} es el volumen (mL) de suspensión de MC empleado y V_E es el volumen (mL) del *pool* enzimático utilizado.

2.2.14. Obtención de los hidrolizados proteicos de NaCAS y WPI

Muestras de NaCAS bovino, ovino o WPI fueron sometidas a hidrólisis enzimática en medio alcalino utilizando PEP7 o PEP45. La hidrólisis fue interrumpida a distintos tiempos por desnaturalización térmica y se determinó el grado de hidrólisis alcanzado para cada tiempo.

Técnica operatoria:

Se colocaron 0,25 g de NaCAS o WPI en erlermeyers a los cuales se agregaron 50 mL de *buffer* TRIS-HCl 0,02 M pH 8 y se incubaron a 45 °C durante 10 min. Posteriormente, se adicionó a cada erlermeyer 1 mL del *pool* enzimático (PEP7, U_{AE} = 8,6 o PEP45, U_{AE} = 7,4), siendo la relación volumen *pool* enzimático/volumen sustrato de 1:50 V/V. A diferentes tiempos de incubación: inmediatamente después de adicionada la enzima (t₀), y 1, 2, 3, 4 y 7 h después (t₁, t₂, t₃, t₄ y t₇ respectivamente), se detuvo la reacción de hidrólisis por calentamiento de las muestras a 100 °C durante 15 min. Las muestras obtenidas fueron centrifugadas 15 min a

10.000xg y los sobrenadantes fueron liofilizados y almacenados en freezer hasta su posterior utilización.

2.2.15. Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) está vinculado a la cantidad de enlaces peptídicos clivados y puede ser determinado midiendo los grupos amino libres por el método del TNBS [122].

Técnica operatoria:

Se mezclaron muestras de hidrolizados proteicos (250 μ L) con un volumen de 2 mL de *buffer* fosfato 0,212 M, pH 8,2 y con 2 mL de TNBS 1%. La mezcla se incubó 1 h a 50 °C y luego se adicionaron 4 mL de HCl 0,1 N. Finalmente se mantuvieron las muestras a T ambiente durante 30 min antes de realizar las lecturas a 340 nm. La cantidad de aminoácidos totales se determinó a partir de una muestra de 10 mg la cual fue hidrolizada completamente en 4 mL de HCl 6 N a 110 °C durante 24 h [123].

2.2.16. Espectrometría de masa

Se determinó la distribución de masa peptídica de los hidrolizados por espectrometría de masa MALDI-TOF-TOF en la plataforma de proteómica del CEQUIBIEM (Universidad de Buenos Aires), usando un espectrómetro de masa Ultraflex II (Bruker Corporation, USA). Se fragmentaron picos con una relación señal/ruido mayor a 10.

2.2.17. Ensayos de bioactividad de los hidrolizados obtenidos

2.2.17.1. Evaluación de la capacidad antioxidante

2.2.17.1.1. Determinación de la actividad secuestradora de radical ABTS \cdot^+

Se realizaron los experimentos utilizando el reactivo ABTS [124] el cual genera un radical cromóforo ABTS \cdot^+ debido a la oxidación del ABTS con persulfato de potasio. El mismo es aplicable tanto para compuestos hidrofílicos como lipofílicos. La extensión de la captura de radicales libres ABTS \cdot^+ es un indicador o medida de la actividad antioxidante.

Técnica operatoria:

El catión radical ABTS \cdot^+ se produjo mediante la reacción de una solución *stock* de ABTS 0,007 M con persulfato de potasio 0,14 M (concentraciones finales) y posterior conservación de la mezcla en la oscuridad por lo menos 12 h a T ambiente antes de su uso. Para el ensayo, la solución del catión radical ABTS \cdot^+ se diluyó con *buffer* fosfato salino (PBS) 0,005

M pH 7,0 para alcanzar una A de 0,7 ($\pm 0,02$) a 734 nm. Se tomaron 10 μL de la muestra y se mezclaron con la solución diluida del catión radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ y luego de 6 min se midió la A a 734 nm.

Los hidrolizados de NaCAS bovinos y ovinos obtenidos con PEP7 o con PEP45 fueron ensayados a 15 g.L^{-1} , los hidrolizados de WPI obtenidos con PEP7 a 15 g.L^{-1} y los obtenidos con PEP45 a 30 g.L^{-1} . Los sueros obtenidos por acción post enzimática de PEP7 o PEP45 fueron ensayados a 15 g.L^{-1} . El compuesto Trolox® se usó como estándar de referencia y los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la A a 734 nm [124], calculado como:

$$\% \text{ Actividad de secuestro} = \left(1 - \frac{A}{A_0} \right) \cdot 100 \quad 2.37$$

donde A_0 es la A del blanco.

2.2.17.1.2. Ensayo de actividad secuestradora de radical DPPH·

Este método, realizado como describen Brand-Williams, Cuvelier, & Berset [125] se basa en la captura del radical DPPH^{\cdot} por antioxidantes, lo cual produce un descenso de la A a 517 nm.

Técnica operatoria:

El DPPH se usó a una concentración de 60 μM disuelto en alcohol metílico. La solución se homogeneizó y se transfirió a frascos color caramelo. La solución se utilizó solamente el día de los análisis. En la oscuridad, alícuotas de 0,1 mL de las muestras se transfirieron a tubos de ensayo con 3,9 mL de solución de radical DPPH^{\cdot} 60 μM y se homogeneizó por agitación. Después de 45 min, la actividad secuestradora se determinó espectrofotométricamente por el descenso de la A a 517 nm. De la misma forma, estas mismas proporciones (0,1 mL de agua destilada y 3,9 mL de radical DPPH^{\cdot}) fueron usadas como control, utilizando alcohol metílico como blanco.

La concentración ensayada de los hidrolizados de NaCAS ovino obtenidos con PEP7 fue de 250 g.L^{-1} y para los hidrolizados de WPI obtenidos con PEP45 fue de 30 g.L^{-1} . La curva patrón se confeccionó con concentraciones de DPPH desde 0 a 60 μM .

Los resultados se expresaron como:

$$\% \text{ Actividad de secuestro} = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \cdot 100 \quad 2.38$$

donde A_0 es la A del blanco.

2.2.17.1.3. Determinación de actividad quelante de metal

Metales de transición, como por ejemplo el Fe^{2+} , promueven la peroxidación lipídica y su secuestro o captura ayuda a retardar este proceso y prevenir de esta forma la rancidez en los alimentos. Se midió la actividad quelante de Fe^{2+} usando el método descrito por Chang et al. con ligeras modificaciones [126-127].

Técnica operatoria:

Se mezcló 1 mL de muestra con 3,7 mL de agua destilada, y posteriormente se le agregó 0,1 mL de FeSO_4 (Fe^{2+}) 0,002 M y 0,2 mL de ferrozina 0,005 M. Se midió la A a 562 nm después de 10 min, usando como control 1 mL de agua destilada en lugar de muestra.

Lo hidrolizados proteicos de NaCAS ovino o bovino obtenidos con PEP7 fueron ensayados a una concentración de 3,5 g.L⁻¹, los hidrolizados de WPI obtenidos con PEP7 a 15 g.L⁻¹ y los obtenidos con PEP45 a 50 g.L⁻¹. Los sueros post coagulación enzimática fueron ensayados a una concentración de 15 g.L⁻¹. Se utilizó EDTA (20 g.L⁻¹) como estándar de referencia.

Los resultados se expresaron como:

$$\% \text{ Actividad quelante} = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \cdot 100 \quad 2.39$$

donde A_0 es la A del control.

2.2.17.1.4. Determinación del poder reductor

El poder reductor de las muestras se determinó según el metodo de Oyaizu el cual se basa en la capacidad de la muestra de reducir el complejo Fe^{3+} /ferricianuro a la forma ferrosa [128].

Técnica operatoria:

Se mezclaron 2,5 mL de las muestras con 2,5 mL de buffer fosfato (0,2 M, pH 6,6) y 2,5 mL de ferricianuro de potasio 1 %, y luego la mezcla se incubó a 50 °C por 20 min. A continuación se agregó 2,5 mL de TCA 10 % y se centrifugó a 3.000xg por 10 min. Se mezclaron 2,5 mL del sobrenadante con 2,5 mL de agua destilada y 0,5 mL de cloruro férrico 1 g.L⁻¹, y se midió la A a 700 nm. Valores altos de A de la mezcla de reacción indican mayor poder reductor.

Los hidrolizados fueron ensayados a 15 g.L⁻¹ y los sueros obtenidos post coagulación enzimática a 5, 10, 15 y 20 g.L⁻¹. Se usó BHT como control positivo a las mismas concentraciones que las muestras.

2.2.17.2. Determinación de actividad antibacteriana

Se determinó la actividad antibacteriana de las muestras contra microorganismos deteriorantes o patógenos presentes en los alimentos como se describe en Motta & Brandelli (2002) [129]. Las cepas ensayadas fueron *Listeria monocytogenes* ATCC 15131, *Bacillus cereus* ATCC 9634, *Staphylococcus aureus* ATCC 1901, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Corynebacterium fimi* NCTC 7547. Este último microorganismo se usó como control positivo debido a que el mismo es descrito como susceptible a todas las bacteriocinas ensayadas [130].

Técnica operatoria:

Los microorganismos indicadores, a concentraciones de 10⁸ unidades formadoras de colonia/mL en solución salina (0,85 %P/V NaCl) fueron inoculados con un algodón sobre placas de petri de agar-BHI. Alícuotas de 15 µL de las muestras se colocaron sobre las cepas indicadoras, preparadas frescas y crecidas sobre toda la superficie de la placa de petri en forma continua y homogénea, y las placas fueron incubadas a la T óptima para cada microorganismo. A continuación, se midieron las zonas de inhibición de crecimiento (representadas por halos claros) y presentada como zona de inhibición (mm). Los hidrolizados proteicos de NaCAS fueron ensayados a una concentración de 250 g.L⁻¹, mientras que los hidrolizados proteicos de WPI a una concentración de 130 g.L⁻¹.

2.2.17.3. Determinación de actividad antifúngica

Para determinar la actividad antifúngica de las muestras se utilizaron los hongos filamentosos *Fusarium oxysporum* ssp. *lycopersici*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium expansum* y la levadura *Candida tropicalis*.

Técnica operatoria:

Lo hidrolizados proteicos de NaCAS se ensayaron a una concentración de 250 g.L⁻¹, mientras que los hidrolizados proteicos de WPI se ensayaron a una concentración de 130 g.L⁻¹.

Los hongos se cultivaron en placas de agar-dextrosa-patata durante 5 días a 30 °C. Se prepararon las suspensiones de células de levadura con el mismo método para determinaciones de actividad antibacteriana. Se prepararon las suspensiones de conidia de los hongos filamentosos, y luego se adicionaron en el agar-dextrosa-patata a 50 °C en un volumen suficiente para lograr una concentración final de 10⁶ conidias/mL. El medio se vertió en placas de petri y luego de la solidificación, se colocaron 15 µL de las muestras a ensayar. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h y a continuación se observó la actividad inhibitoria contra los indicadores fúngicos.

2.2.18. Análisis estadístico

Las distintas determinaciones se realizaron al menos por triplicado. Los datos fueron reportados como el valor medio ± sus desviaciones estándares. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante los programas informáticos indicados en la Sección 2.1.4. Las relaciones entre variables fueron analizadas estadísticamente por análisis de correlación utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (r). Para los análisis de la varianza se verificaron los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia de las observaciones. Se usó el Test de Tuckey HSD para comparaciones multiples y en el caso de análisis de la varianza con dos criterios de clasificación con una replica, se utilizó el Test de Aditividad de Tuckey para evaluar la interacción entre los factores involucrados. La significancia estadística fue considerada para valores de $p < 0,05$.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Evaluación del estado inicial del NaCAS bovino y ovino previo a la hidrólisis

3.1.1. Efecto de la presencia de iones calcio

3.1.1.1. Estabilidad coloidal (Solubilidad)

Con el objetivo de evaluar el estado inicial de las caseínas bovinas y ovinas previo a la hidrólisis enzimática, se evaluó la estabilidad coloidal de suspensiones de NaCAS en ausencia y en presencia de Ca^{2+} , catión presente en la leche, con un importante rol biológico y que para estar biodisponible debe ser ligado a CN estables en suspensión. En presencia de Ca^{2+} , parte del CAS forma agregados coloidales de caseinato de calcio (ACC) estables en suspensión.

Tal como se indicó en la Sección 2.2.5, se determinó la concentración proteica remanente en solución (S_{ap} , solubilidad aparente), obtenida durante la precipitación del NaCAS bovino inducida por diferentes concentraciones de Ca^{2+} total. Dichos valores experimentales y el ajuste matemático de los mismos con la Ecuación 2.19 se presentan en las Figuras 3.1, 3.2 y 3.3.

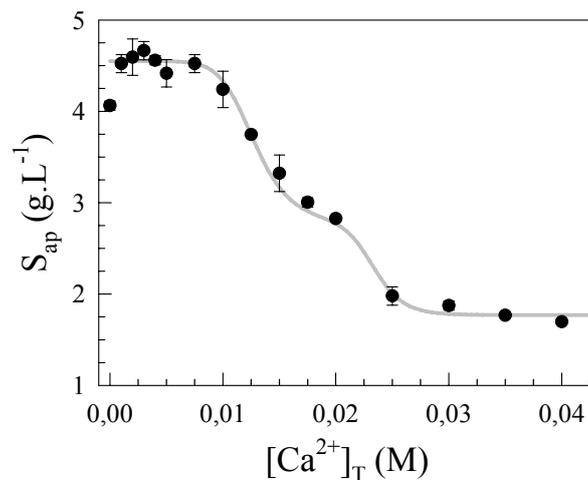


Figura 3.1. Solubilidad de las suspensiones de ACC (S_{ap}) a distintas concentraciones de calcio total, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{T}}$ (M). Concentración inicial de NaCAS bovino: 5 g.L⁻¹. La curva continua (—) corresponde al ajuste matemático de los datos con la Ecuación 2.19.

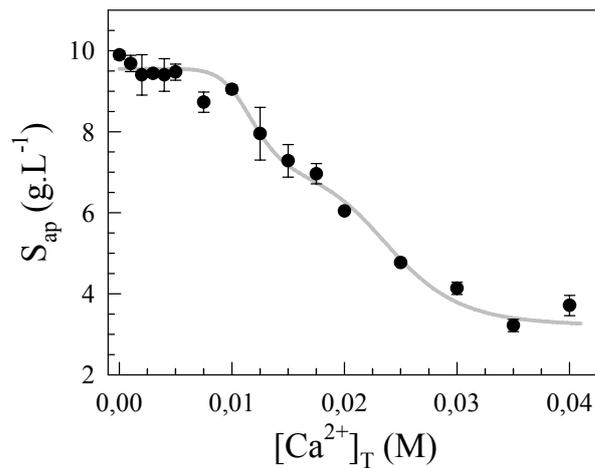


Figura 3.2. Solubilidad de las suspensiones de ACC (S_{ap}) a distintas concentraciones de calcio total, $[Ca^{2+}]_T$ (M). Concentración inicial de NaCAS bovino: 10 $g.L^{-1}$. La curva continua (—) corresponde al ajuste matemático de los datos con la Ecuación 2.19.

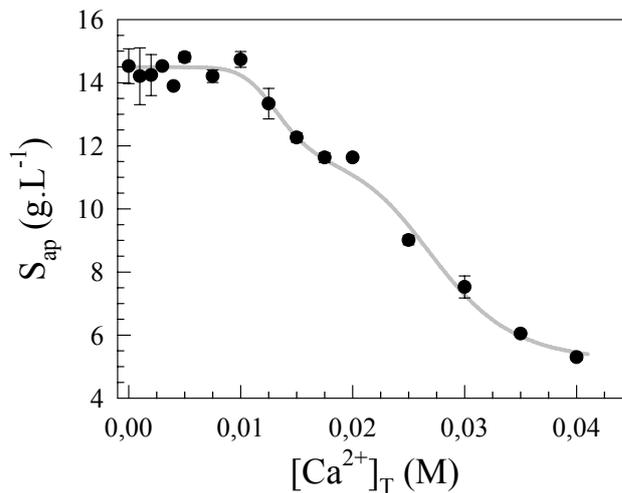


Figura 3.3. Solubilidad de las suspensiones de ACC (S_{ap}) a distintas concentraciones de calcio total, $[Ca^{2+}]_T$ (M). Concentración inicial de NaCAS bovino: 15 $g.L^{-1}$. La curva continua (—) corresponde al ajuste matemático de los datos con la Ecuación 2.19.

Los valores de los parámetros de estabilidad coloidal S_1 y S'_1 , K_1 y K'_1 , y n y n' del NaCAS bovino, los cuales se determinaron a 25 °C y pH 6,8 se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Parámetros de estabilidad coloidal de de los ACC a diferentes concentraciones iniciales de NaCAS bovino estimados por regresión no lineal utilizando la Ecuación 2.19. T = 25 °C y pH 8

NaCAS ($g.L^{-1}$)	S_1 ($g.L^{-1}$) ^a	K_1 (M^{-1}) ^a	n	S'_1 ($g.L^{-1}$) ^a	K'_1 (M^{-1}) ^a	n'
5	$2,78 \pm 0,01$	$78,2 \pm 0,4$	8	$1,77 \pm 0,05$	43 ± 1	18
10	$6,9 \pm 0,2$	82 ± 3	8	$3,2 \pm 0,2$	41 ± 1	8
15	$11,4 \pm 0,3$	76 ± 4	8	$5,1 \pm 0,3$	36 ± 1	8

^a valores estimados \pm desviación estándar

A partir de los resultados obtenidos para NaCAS bovino, se observó que en la primera etapa de *salting-out* los valores de n y K_1 se mantuvieron prácticamente constantes, pero en la segunda etapa de *salting-out* ocurrió una reducción en el valor de K'_1 (\sim mitad) y un valor constante de n' , excepto para C_{NaCAS} de 5 g.L^{-1} .

Esto indicaría que la primera etapa de *salting-out*, inducida por el Ca^{2+} , no es afectada por cambios en la C_{NaCAS} (K_1 prácticamente constante). Es decir, que en esta etapa, agregados preexistentes presentarían la misma accesibilidad al catión y éste interactuaría con la misma población de sitios de unión.

Si la concentración de Ca^{2+} iguala a la inversa de K_1 , la S_{ap} queda determinada por la siguiente ecuación:

$$S_{\text{ap}} = \left(\frac{S_0 + S_1}{2} \right) \quad 3.1$$

El valor de $1/K_1$ es el valor de concentración a la cual ha ocurrido el 50 % de la desestabilización. Los valores obtenidos de esta manera, para las distintas concentraciones proteicas iniciales ($5\text{-}15 \text{ g.L}^{-1}$), se encuentran en el rango de concentraciones de Ca^{2+} de $0,0118\text{-}0,0139 \text{ M}$, indicando un aumento en la estabilidad del sistema con el aumento de la C_{NaCAS} .

La constante de equilibrio K'_1 , correspondiente a la segunda etapa de *salting-out*, evidenció una leve disminución a la C_{NaCAS} más alta, indicando que la concentración afecta esta etapa generándose condiciones que incrementan la estabilidad de los ACC. Esto podría deberse a una variación en la población de los sitios de unión disponibles del CAS y a su diferente accesibilidad para asociarse al Ca^{2+} debido a cambios estructurales. La composición proteica podría ser diferente si existe una mayor cantidad de proteína presente. Los sitios de unión n y n' calculados son valores promedios de poblaciones de sitios y estarían de alguna manera relacionados con el número de grupos de residuos de carboxilato y fosfoserina de las CN, los cuales actúan como sitios de unión [90, 108, 131]. A bajas C_{NaCAS} , el arreglo espacial de los ACC expone mayor número de grupos inespecíficos.

Debido a que la composición y conformación del CAS en la presencia de Ca^{2+} puede variar a medida que la concentración de proteína se modifica, es necesario evaluar la S_{ap} a diferentes C_{NaCAS} , a igual relación $\text{Ca}^{2+}:\text{CAS}$. Para el NaCAS bovino, en la Figura 3.4, se muestra como a una dada relación $\text{Ca}^{2+}:\text{CAS}$, la solubilidad porcentual (calculada como $S_{\text{ap}} \cdot 100 / C_{\text{NaCAS}}$) decreció a medida que se incrementó la C_{NaCAS} . Este resultado indica que una mayor cantidad de proteína presente favorecería el equilibrio de precipitación inducido por Ca^{2+} .

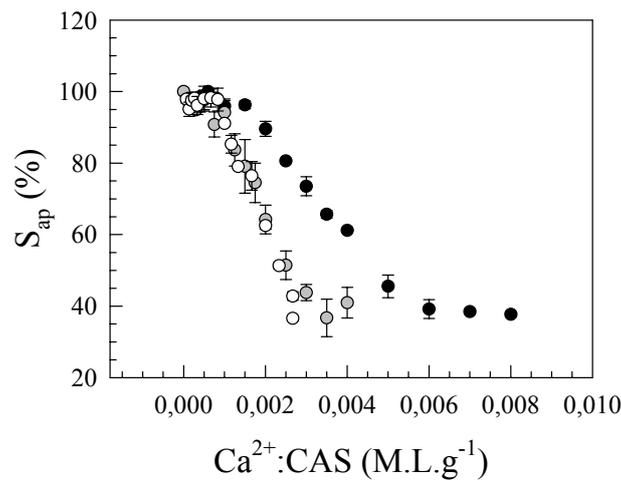


Figura 3.4. Solubilidad porcentual de los ACC en función de la relación $\text{Ca}^{2+}:\text{CAS}$ (M.L.g^{-1}). C_{NaCAS} bovino inicial: (●) 5 g.L^{-1} , (◐) 10 g.L^{-1} , (○) 15 g.L^{-1} .

Al estudiar la estabilidad coloidal del NaCAS ovino (5 g.L^{-1}) en presencia de Ca^{2+} , se observó similitud en el perfil de S_{ap} vs. $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{T}}$ con el perfil del NaCAS bovino (5 g.L^{-1}), diferenciándose entre sí en los valores de los parámetros de solubilidad. La forma de la curva obtenida para ambos CAS, muestra la presencia de dos procesos de *salting-out* bien definidos.

El proceso de precipitación comenzó a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{T}}$ de $\sim 0,003 \text{ M}$, continuando hasta que precipitó una importante fracción proteica (50% del total de proteína precipitada a $0,02 \text{ M}$ de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{T}}$). Esto puede observarse en las Figura 3.5.

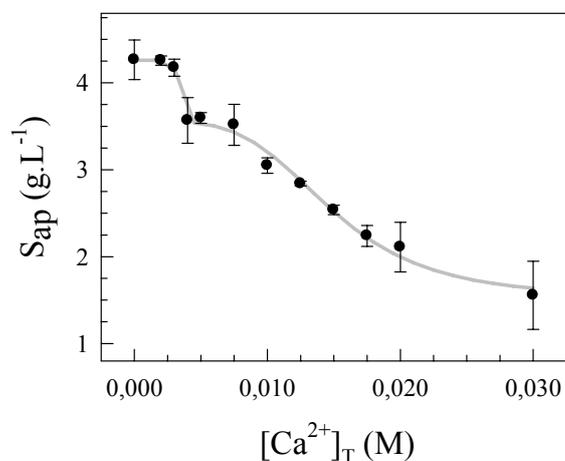


Figura 3.5. Solubilidad de las suspensiones de ACC (S_{ap}) a distintas concentraciones de calcio total $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{T}}$ (M). C_{NaCAS} ovino inicial 5 g.L^{-1} . La curva continua (—) corresponde al ajuste matemático de los datos con la Ecuación 2.19.

Comparando estos resultados con los obtenidos para NaCAS bovino de igual concentración, se observó que en este último caso la precipitación comenzó aproximadamente al doble de valores de $[Ca^{2+}]_T$ y solo un 35 % de CAS bovino fue precipitado a 0,02 M de $[Ca^{2+}]_T$ (Figura 3.6).

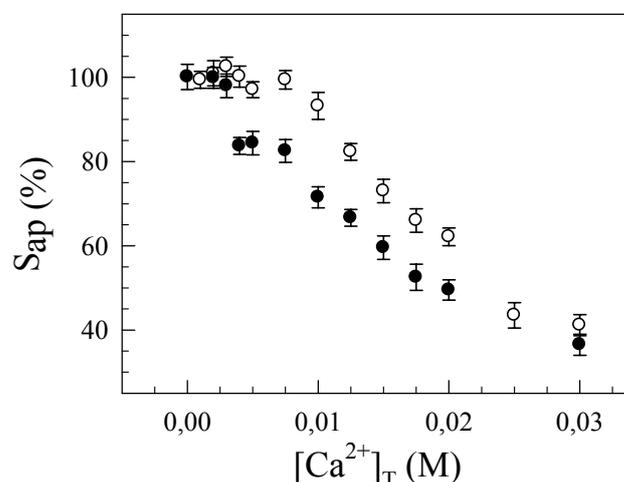


Figura 3.6. Valores experimentales promedios de fracción S_{ap} de los ACC ovinos (●) y bovinos (○) (C_{NaCAS} inicial 5 g.L^{-1} en ambos casos) como función de $[Ca^{2+}]_T$, pH 6,8 y 25°C .

En la Tabla 3.2 se presentan los parámetros de estabilidad coloidal obtenidos por el ajuste no lineal aplicando la Ecuación 2.19 para ambas C_{NaCAS} iniciales ensayadas.

Tabla 3.2. Parámetros de estabilidad coloidal de ACC ovinos y bovinos obtenidos por regresión no lineal con la Ecuación 2.19. $T = 25^\circ\text{C}$ y pH 6,8.

Parámetros	$K_1 \text{ (M}^{-1}\text{)}^a$	n	$K'_1 \text{ (M}^{-1}\text{)}^a$	n'
NaCAS ovino (5 g.L^{-1})	306 ± 6	23	67 ± 2	4
NaCAS bovino (5 g.L^{-1})	$78,2 \pm 0,4$	8	43 ± 1	18

^a valores estimados \pm desviación estándar

Tanto para las muestras bovina y ovinas, se observaron en los perfiles de solubilidad, dos clases de sitios de unión al Ca^{2+} (Figura 3.1, 3.2, 3.3 y 3.5), presentando constantes promedio de unión aparentes que difirieron en un orden de magnitud. Los valores de K_1 corresponden al paso inicial de proceso de precipitación. Debido a que la afinidad al Ca^{2+} de los residuos de fosfoserina es mayor que la de cualquier otro sitio de unión, se asume que este primer paso de unión del Ca^{2+} involucra principalmente a dichos residuos [16, 107]. Sin embargo, en esta etapa no se puede descartar la participación de otros residuos aniónicos, tales como los grupos

carboxilatos. Para la constante promedio de asociación de la segunda etapa de *salting-out* (K'_1 , Tabla 3.2) se obtuvieron valores menores, sugiriendo la participación de sitios de menor afinidad en este proceso. Los valores de las constantes K_1 y K'_1 y números de sitios de unión n fueron mayores para el NaCAS ovino comparado con los valores para el NaCAS bovino.

El NaCAS ovino fue precipitado en un 50% a una concentración relativamente menor de $[Ca^{2+}]_T$, (0,0032 M, calculada como $1/K_1$), mientras que el NaCAS bovino precipitó en un 50% a una concentración de 0,0128 M. En todo el rango de concentración de $[Ca^{2+}]_T$, estudiado se observó que, para una dada $[Ca^{2+}]_T$, la S_{ap} del NaCAS ovino fue siempre menor en comparación a la S_{ap} del NaCAS bovino (Figura 3.6).

3.1.1.2. Composición proteica

Se determinó por SDS-PAGE la composición en α_S -, β -, y κ -CN del C_{NaCAS} bovino a 5, 10 y 15 g.L⁻¹ y sus correspondientes ACC (Figura 3.7), como así también para el C_{NaCAS} ovino a 5 g.L⁻¹ y sus ACC (Figura 3.8). La composición porcentual fue calculada usando un programa informático (X-GEL) especialmente diseñado para el análisis de la densidad de *píxels* de las bandas proteicas digitalizadas (Ver Sección 2.2.4).

Usando este método se obtuvieron los siguientes porcentajes de masa de CN para el NaCAS bovino: 44 % α_S -CN, 33 % β -CN, y 24 % κ -CN. Siendo los mismos similares a los publicados en la literatura por Mora-Gutierrez [109]. Para una C_{NaCAS} inicial de 15 g.L⁻¹, se evidenció una precipitación uniforme de todas las CN (Figura 3.7.A). Para C_{NaCAS} inicial de 10 g.L⁻¹, se observó una precipitación importante de las fracciones α_S - y κ -CN y un consecuente aumento en la fracción porcentual de β -CN en los ACC (Figura 3.7.B). Para C_{NaCAS} de 5 g.L⁻¹, se reveló una marcada precipitación de α_S -CN y una composición constante de κ -CN resultando en un aumento de la fracción porcentual de β -CN (Figura 3.7.C). La mayor precipitación de α_S -CN se podría relacionar con la aparición de una especie de “hombro” en la curva de solubilidad. Las distintas CN precipitadas dependieron de la concentración inicial de C_{NaCAS} como puede evaluarse en los perfiles de solubilidad.

En la segunda etapa de *salting-out*, se puede observar una disminución en la fracción de α_S -CN y un incremento en las de β - y κ -CN para las tres C_{NaCAS} iniciales analizadas. Se puede inferir que, si bien todas las CN precipitaron, la α_S -CN lo hizo en una mayor extensión. Estos resultados son consistentes con aquellos obtenidos por Pitkowski et al. [132].

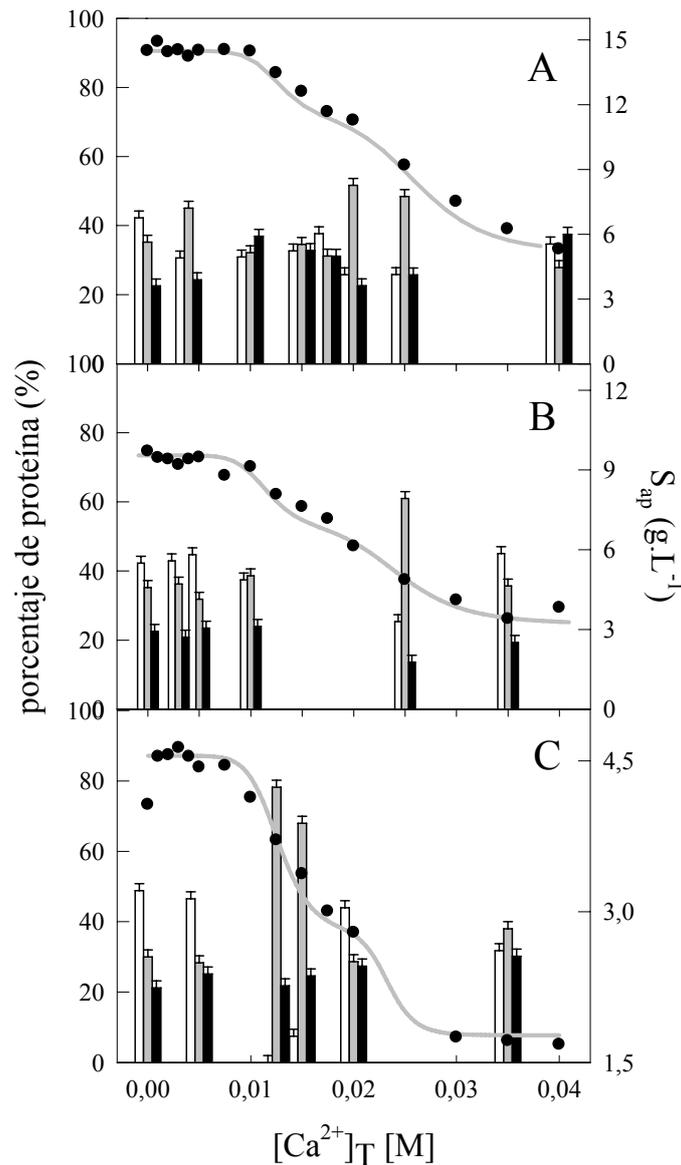


Figura 3.7. Composición proteica (barras) y solubilidad (●) de ACC bovino para distintas relaciones $\text{Ca}^{2+}:\text{CAS}$; C_{NaCAS} bovino inicial: **A)** 15 g.L^{-1} , **B)** 10 g.L^{-1} , **C)** 5 g.L^{-1} . $\alpha_s\text{-CN}$ (□), $\beta\text{-CN}$ (■) y $\kappa\text{-CN}$ (■).

Los ACC ovinos, para todas las $[\text{Ca}^{2+}]_T$, presentaron mayor cantidad de $\alpha_s\text{-CN}$ y $\beta\text{-CN}$, en comparación a $\kappa\text{-CN}$ (Figura 3.8). Por otro lado, la fracción porcentual de $\kappa\text{-CN}$ ovina fue siempre menor en comparación a la fracción porcentual de $\kappa\text{-CN}$ bovina (Figura 3.7.C). Esto se podría relacionar con el mayor tamaño medio de los ACC ovinos para todas las $[\text{Ca}^{2+}]_T$, ya que la $\kappa\text{-CN}$ es la que limita el crecimiento de los ACC [133].

Los cambios observados en composición para los ACC bovinos no se detectaron en los sistemas de origen ovino debido probablemente a las diferencias existentes entre ambas especies en el número de residuos fosforilados de la α_S -CN (Figura 3.7 y 3.8).

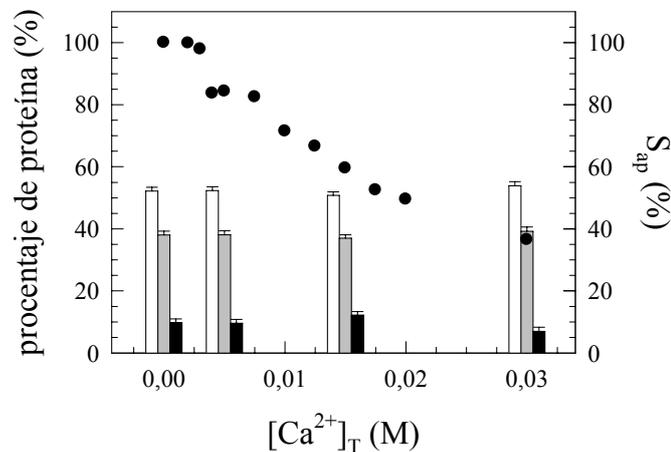


Figura 3.8. Composición proteica porcentual (barras) y solubilidad proteica de los ACC ovinos (●) en función de $[Ca^{2+}]_T$. (□) α_S -CN, (■) β -CN y (■) κ -CN. C_{NaCAS} ovino inicial de 5 g.L^{-1}

De acuerdo a los resultados obtenidos, a una dada T y pH, los ACC ovinos fueron menos estables que los ACC bovinos. Las diferencias observadas podrían estar relacionadas a la composición y a las diferentes proporciones de CN en la leche de vaca y en la de oveja [107]. La leche de oveja presenta mayores proporciones de α_S - y β -CN [134], las cuales tienen una gran cantidad de residuos fosfoserina con la capacidad de unir al Ca^{2+} , lo cual lleva a que las CN ovinas sean más sensibles a la precipitación por este catión.

3.1.1.3. Cambios en el tamaño medio de los ACC

El grado de agregación de los ACC fue estudiado mediante la determinación de la τ de las suspensiones de NaCAS bovino (5, 10, y 15 g.L^{-1}) y NaCAS ovino (5 g.L^{-1}).

En la Figura 3.9 se observa la variación de τ en función de la relación Ca^{2+} :CAS para los ACC bovinos a diferentes concentraciones proteicas iniciales de NaCAS y en la Figura 3.10 se muestra la comparación del cambio de τ en función de la $[Ca^{2+}]_T$ para ambos CAS a una concentración de 5 g.L^{-1} . Se observó, en todos los casos, un incremento inicial de los valores de τ seguido por un descenso del mismo aunque sin alcanzar nuevamente su valor inicial. Esto indicaría un incremento en el número de partículas como resultado del incremento de $[Ca^{2+}]_T$. Se puede asumir que el ión Ca^{2+} tendría la habilidad para disociar agregados preexistentes de

NaCAS. Debido a que la τ depende de la concentración de las partículas, este último factor explicaría el incremento en los valores de τ para una relación $\text{Ca}^{2+}:\text{CAS}$ dada.

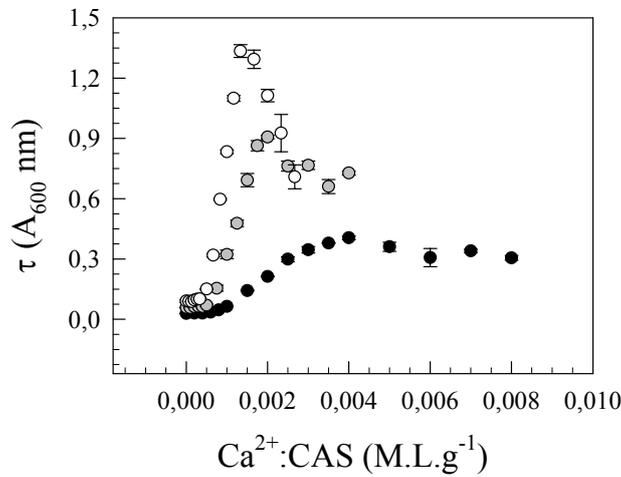


Figura 3.9. Turbidez (τ) de los ACC bovinos en función de la relación $\text{Ca}^{2+}:\text{CAS}$ (M.L.g^{-1}). C_{NaCAS} bovino inicial: 5 g.L^{-1} (●), 10 g.L^{-1} (◐) y 15 g.L^{-1} (○).

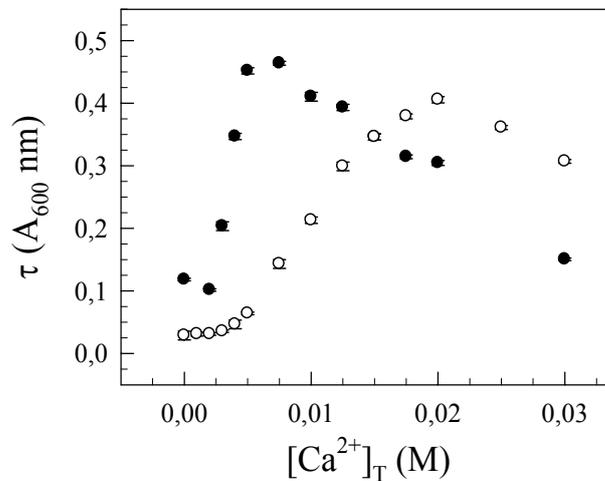


Figura 3.10. Turbidez (τ) de los ACC ovinos (●) y bovinos (○) (C_{NaCAS} inicial de 5 g.L^{-1} en ambos casos) como una función de $[\text{Ca}^{2+}]_T$, pH 6,8 y $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

La τ se incrementó hasta alcanzar un máximo a $0,02 \text{ M}$ de $[\text{Ca}^{2+}]_T$ en el caso de NaCAS bovino y hasta alcanzar $0,0075 \text{ M}$ de $[\text{Ca}^{2+}]_T$ en el caso de NaCAS ovino, disminuyendo a partir de allí para ambos casos (Figura 3.10).

También se llevó a cabo un estudio de la variación del tamaño medio de los ACC, para lo cual se evaluaron los cambios del parámetro β , el cual está relacionado en forma directa con el

tamaño medio de las partículas en solución (Ver Sección 2.2.3). En la Figura 3.11, 3.12 y 3.13, para NaCAS bovino, se puede apreciar que, para todas las C_{NaCAS} iniciales estudiadas, en la presencia de un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_T$, el tamaño medio de los ACC decreció inicialmente (disminución del parámetro β) hasta que se alcanzó un mínimo seguido de un leve incremento en el tamaño medio, pero en todos los casos, estos valores se hallaron por debajo de sus valores iniciales. Cuando $[\text{Ca}^{2+}]_T$ se incrementó, los agregados preexistentes sufrieron una brusca caída en su tamaño medio hasta que los mismos alcanzan un mínimo en un rango de 0,0075 a 0,01 M de $[\text{Ca}^{2+}]_T$, antes de alcanzar la mitad de la desestabilización de la primera etapa de *salting-out*. Como consecuencia, el tamaño de los agregados se incrementó hasta un valor constante.

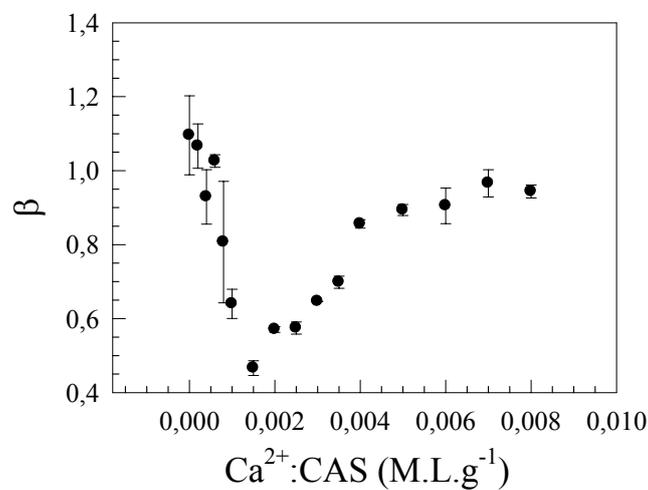


Figura 3.11. Parámetro β de los ACC bovinos vs. relación $\text{Ca}^{2+}:\text{CAS}$ (M.L.g⁻¹), C_{NaCAS} bovino inicial de 5 g.L⁻¹ (●).

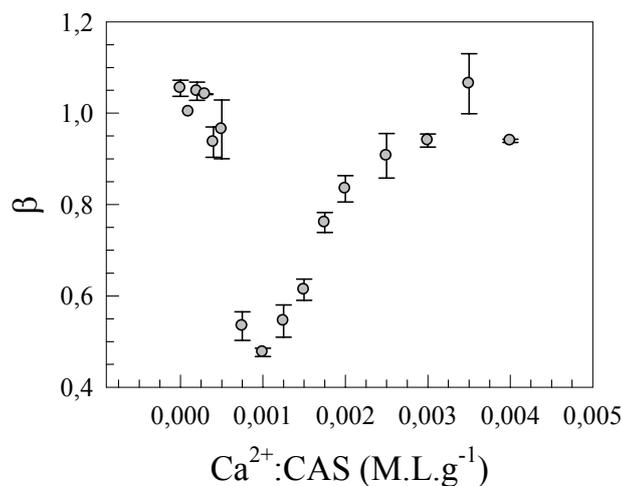


Figura 3.12. Parámetro β de los ACC bovinos vs. relación $\text{Ca}^{2+}:\text{CAS}$ (M.L.g⁻¹), C_{NaCAS} bovino inicial de 10 g.L⁻¹ (○).

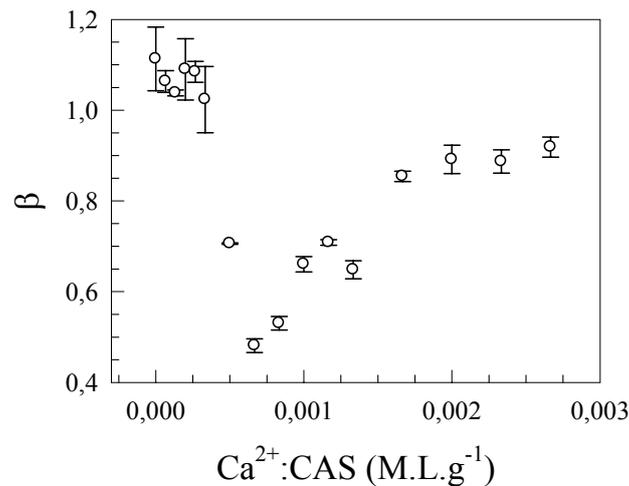


Figura 3.13. Parámetro β de los ACC bovinos vs. relación $\text{Ca}^{2+}:\text{CAS}$ (M.L.g^{-1}), C_{NaCAS} bovino inicial de 15 g.L^{-1} (\diamond).

A modo de comparación se presentan los resultados obtenidos para C_{NaCAS} ovino inicial de 5 g.L^{-1} en forma conjunta con los correspondientes para C_{NaCAS} bovino 5 g.L^{-1} (Figura 3.14).

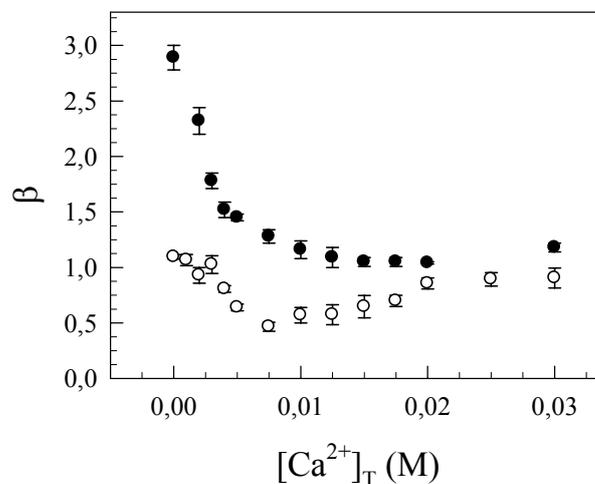


Figura 3.14. Parámetro β de los ACC ovino (\bullet) y bovino (\circ) (C_{NaCAS} inicial de 5 g.L^{-1} en ambos casos) como función de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{T}}$ a pH 6,8 y 25°C .

Para los ACC ovinos, los valores del parámetro β decrecieron abruptamente hasta alcanzar $\sim 0,005 \text{ M}$ de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{T}}$ y luego continuaron decreciendo más lentamente (Figura 3.14). Estos resultados indicarían la desaparición de los ACC de mayor tamaño a altas $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{T}}$. Para NaCAS bovino los resultados indicarían una formación inicial de pequeñas cantidades de partículas relativamente pequeñas, seguido de un segundo paso con la posterior formación progresiva de partículas más grandes. Por otra parte, se observó que el tamaño medio de los

ACC ovinos siempre fue mayor en comparación a los ACC bovinos, especialmente a bajas $[Ca^{2+}]_T$.

3.1.1.4. Viscosidad intrínseca y el volumen específico parcial

La viscosidad intrínseca ($[\eta]$) y el volumen específico parcial (\bar{v}_2) fueron determinados, como se indica en la Sección 2.2.6, a partir de medidas de η y de ρ en un rango de C_{NaCAS} bovino de 6 a 16 $g.L^{-1}$ y bajo distintas relaciones $Ca^{2+}:CAS$ (0 , $0,2 \cdot 10^{-3}$, $0,25 \cdot 10^{-3}$, y $0,5 \cdot 10^{-3}$) $M.L.g^{-1}$ (Figura 3.15 y 3.16).

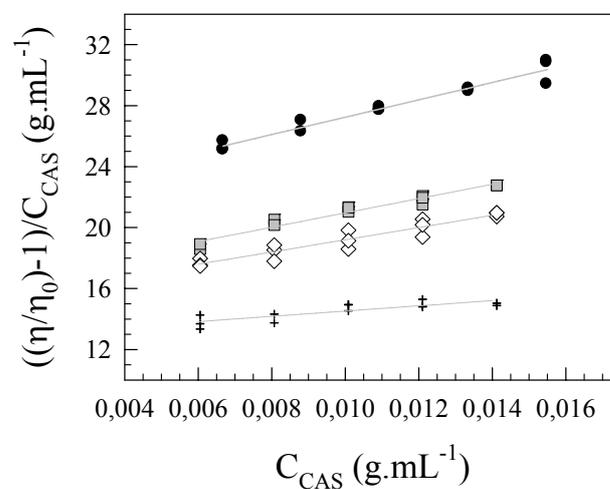


Figura 3.15. Viscosidad intrínseca $[\eta]$ de ACC bovinos. $((\eta/\eta_0)-1)/C_{CAS}$ vs. C_{CAS} . Relación $Ca^{2+}:CAS$ ($M.L.g^{-1}$): 0 (●); $0,2 \cdot 10^{-3}$ (■); $0,25 \cdot 10^{-3}$ (◇); $0,5 \cdot 10^{-3}$ (+). Líneas continuas: ajustes lineales correspondientes.

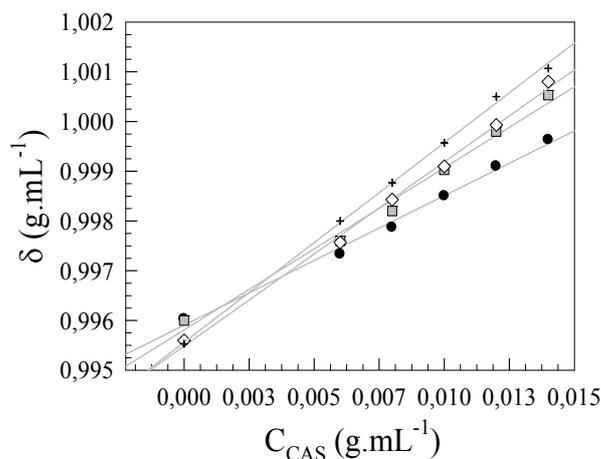


Figura 3.16. Volumen específico parcial (\bar{v}_2) para ACC bovinos. Densidad (δ) en función de C_{CAS} . Relación $Ca^{2+}:Cas$ ($M.L.g^{-1}$): 0 (●); $0,2 \cdot 10^{-3}$ (■); $0,25 \cdot 10^{-3}$ (◇); $0,5 \cdot 10^{-3}$ (+). Líneas continuas: ajustes lineales correspondientes.

En la Tabla 3.3 se muestran los valores calculados correspondientes a $[\eta]$, \bar{v}_2 , y v .

Tabla 3.3. Valores calculados de $[\eta]$, \bar{v}_2 y v para ACC bovinos a diferentes relaciones $\text{Ca}^{2+}:\text{CAS}$. $T = 30$ °C y pH 6,8.

$\text{Ca}^{2+}:\text{CAS (M.L.g}^{-1})$	$[\eta] (\text{mL.g}^{-1})^a$	$\bar{v}_2 (\text{mL.g}^{-1})^b$	v^c
0	21,6 ± 0,3	0,73 ± 0,02	29,6 ± 0,1
0,2.10 ⁻³	16,3 ± 0,5	0,66 ± 0,02	24,7 ± 0,1
0,25.10 ⁻³	15,2 ± 0,4	0,64 ± 0,02	23,6 ± 0,1
0,5.10 ⁻³	12,8 ± 0,2	0,60 ± 0,02	21,2 ± 0,1

^a valores estimados con la Ecuación 2.23 ± desviación estándar

^b valores estimados con la Ecuación 2.26 ± desviación estándar

^c valores estimados con la Ecuación 2.27 ± desviación estándar

Se observó una reducción en la $[\eta]$ y en v mientras la relación $\text{Ca}^{2+}:\text{CAS}$ aumenta, probablemente debido a una disminución en el grado de hidratación de los ACC. Los valores de v decrecieron significativamente, indicando que un incremento en la relación de $\text{Ca}^{2+}:\text{CAS}$ también causaría o sería responsable de un aumento en la simetría de los ACC.

A partir de las determinaciones de $[\eta]$, \bar{v}_2 , y v se puede inferir que los ACC en la presencia de Ca^{2+} alcanzan una mayor simetría y un menor grado de hidratación (estructuras más compactas) en comparación con los obtenidos en ausencia del catión.

3.1.1.5. Conformación proteica evaluada mediante espectrofluorimetría

Se determinó la S_H de los ACC para C_{NaCAS} bovino inicial de 0,15 g.L⁻¹ y para diferentes relaciones $\text{Ca}^{2+}:\text{CAS}$, rango en que no se observa precipitación, como se indica en la Sección 2.2.7. En presencia de Ca^{2+} , no se observaron cambios significativos en los valores de S_H al variar la relación $\text{Ca}^{2+}:\text{CAS}$ (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Valores S_H de ACC bovinos a diferentes $[\text{Ca}^{2+}]$ obtenidos a pH 6,8 y 25 °C. $C_{\text{CAS}} 0,15 \text{ g.L}^{-1}$

$[\text{Ca}^{2+}] (\text{mM})$	$\text{Ca}^{2+}:\text{CAS (M.L.g}^{-1})$	$S_H (\text{mL.g}^{-1})^a$
0	0	1,35 ± 0,07
0,225	0,0075	1,37 ± 0,04
0,375	0,0125	1,37 ± 0,01
0,6	0,0200	1,49 ± 0,01
0,75	0,0250	1,40 ± 0,02

^a valores promedios ± desviación estándar

Por otra parte, se obtuvieron los espectros de emisión de IF de suspensiones acuosas de NaCAS bovino ($0,15 \text{ g.L}^{-1}$) en ausencia y presencia CaCl_2 ($0,0004$ - $0,00207 \text{ M}$) a pH 6,8 (Figura 3.17).

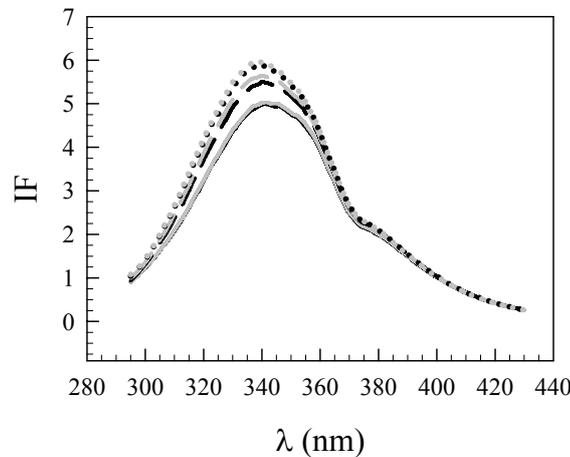


Figura 3.17. Intensidad de fluorescencia (IF) intrínseca vs. longitud de onda (λ) de mezclas de NaCAS bovino ($0,15 \text{ g.L}^{-1}$) y CaCl_2 : (—) Sin Ca^{2+} , (—) $0,0004 \text{ M}$ [Ca^{2+}], (— —) $0,00083 \text{ M}$ [Ca^{2+}], (— — —) $0,00124 \text{ M}$ [Ca^{2+}], (•••••) $0,00165 \text{ M}$ [Ca^{2+}], (••••••) $0,00207 \text{ M}$ [Ca^{2+}]. Rango $\lambda_{\text{em}} = 295$ - 430 nm , $\lambda_{\text{exc}} = 281 \text{ nm}$, T 25°C y pH 6,8.

Se observó un corrimiento del máximo de IF en los espectros de emisión hacia la banda azul con un aumento de la IF que se magnificó con el aumento de la relación Ca^{2+} :CAS. Esto indicaría un cambio en las cercanías de los fluoróforos proteicos hacia un entorno de baja polaridad con características hidrofóbicas.

En el caso del NaCAS ovino, se obtuvieron los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de suspensiones acuosas ($0,15 \text{ g.L}^{-1}$) en ausencia y en presencia de CaCl_2 ($0,0004$ - $0,00207 \text{ M}$) a pH 6,8 (Figura 3.18).

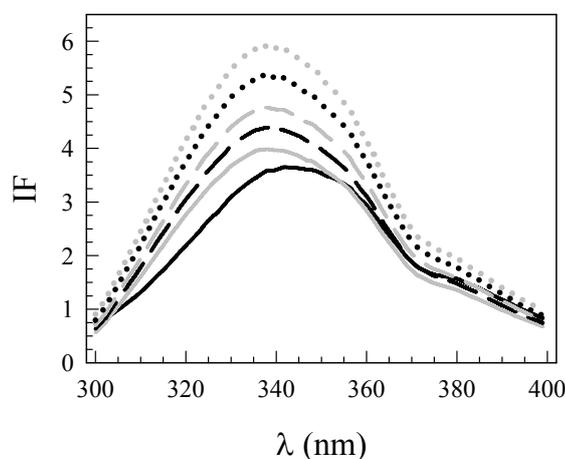


Figura 3.18. Intensidad de fluorescencia (IF) intrínseca vs. longitud de onda (λ) de mezclas de NaCAS ovino ($0,15 \text{ g.L}^{-1}$) y CaCl_2 : (—) sin Ca^{2+} ; (—) $0,0005$ [Ca^{2+}]; (— —) $0,001$ [Ca^{2+}]; (— — —) $0,0015$ [Ca^{2+}]; (•••••) $0,002$ [Ca^{2+}]; y (••••••) $0,0025 \text{ M}$ [Ca^{2+}]. Rango $\lambda_{\text{em}} = 300$ - 400 nm , $\lambda_{\text{exc}} = 286 \text{ nm}$, T 25°C y pH 6,8.

Se observó un corrimiento del máximo de emisión hacia la banda azul como también un incremento en la IF intrínseca a medida que aumentó la relación $\text{Ca}^{2+}:\text{CAS}$. En este caso también se puede inferir que esto se debe a un cambio en el entorno de los grupos fluoróforos de las CN hacia ambientes más hidrofóbicos.

Se determinó la S_H para ACC ovinos ($C_{\text{NaCAS}} = 1 \text{ g.L}^{-1}$) para distintas cantidades de Ca^{2+} añadidas. Las mismas se muestran la siguiente Tabla.

Tabla 3.5. Valores S_H de NaCAS ovino 1 g.L^{-1} a diferentes $[\text{Ca}^{2+}]$ obtenidos a $35 \text{ }^\circ\text{C}$.

$[\text{Ca}^{2+}]$ (mM)	$\text{Ca}^{2+}:\text{CAS}$ (M.L.g ⁻¹)	S_H (mL.g ⁻¹) ^a
0	0	$1,5 \pm 0,1$
0,5	0,0005	$0,86 \pm 0,03$
1	0,001	$0,74 \pm 0,02$
1,5	0,0015	$1,06 \pm 0,02$
2	0,002	$0,85 \pm 0,01$
2,5	0,0025	$0,60 \pm 0,03$

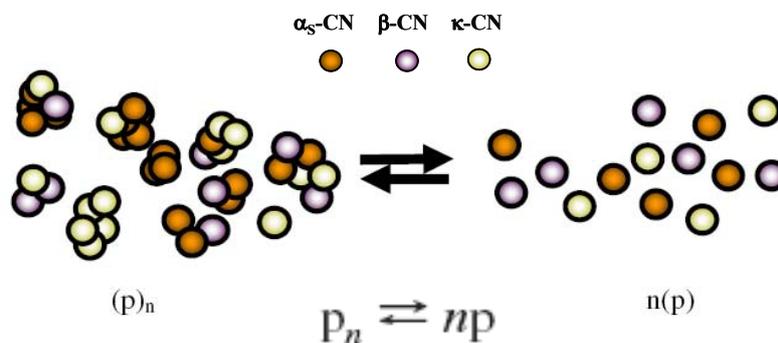
^a Valores promedio \pm desviación estándar

El mayor valor de S_H se observó en ausencia de Ca^{2+} , luego S_H presentó una tendencia a disminuir para valores crecientes del mismo. Estos resultados indicarían la formación de ACC ovinos de estructura más compacta cuando el Ca^{2+} se encuentra presente.

3.1.1.6. Modelo propuesto para el sistema $\text{CAS}/\text{Ca}^{2+}$

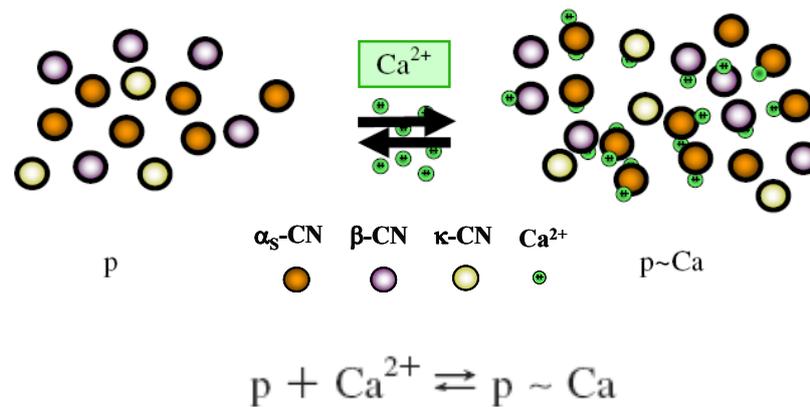
Los resultados obtenidos para sistemas proteína-calcio, en los rangos de concentraciones ensayados, a T y pH constantes, indicarían que las partículas de CAS estarían involucradas en múltiples equilibrios. Por lo tanto, se propone un modelo para la explicitación de los mismos.

El primer equilibrio ocurre entre la proteína asociada (p_n) y la disociada (p):



Se conoce que el NaCAS en solución acuosa tiene un marcado grado de asociación (como submicelas o micelas), y que el grado de estas asociaciones entre las partículas de CN depende de factores tales como la concentración de proteína, la composición proteica, concentración del ión Ca^{2+} , fuerza iónica, T y pH [135-136].

El segundo equilibrio correspondería a la incorporación del Ca^{2+} al CAS (primera etapa de *salting-out*). Este cosoluto se uniría inicialmente a la proteína disociada debido a la mayor accesibilidad a los sitios de unión disponibles:

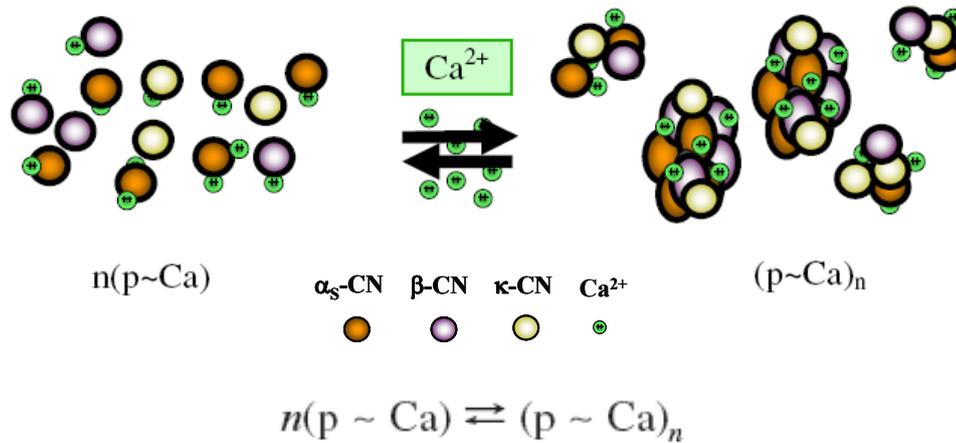


donde p representa a las caseínas (α_s , β y κ), y p~Ca a partículas de CN unidas a Ca^{2+} .

La unión del Ca^{2+} a la proteína en el segundo equilibrio desplazaría el primer equilibrio, generando una disminución en la cantidad de submicelas o micelas agregadas y en el tamaño medio de las partículas y/o agregados coloidales en suspensión (el parámetro β disminuye). Sin embargo, la τ de las muestras aumentó, indicando esto un incremento en la cantidad de partículas agregadas de tamaño promedio menor.

A medida que se aumenta la concentración de Ca^{2+} (aumento de la relación $\text{Ca}^{2+}:\text{CAS}$), el tamaño medio de las partículas en suspensión se incrementó hasta alcanzar un máximo (valor del parámetro β máximo). Si se continúa aumentando la concentración del catión, los agregados de gran tamaño precipitan y los ACC estables en suspensión se compactan. Esto se corrobora con los perfiles de la variación de τ y η vs. la concentración de Ca^{2+} que fueron informados previamente (Secciones 3.1.1.3 y 3.1.1.4).

Este comportamiento está ejemplificado en el tercer equilibrio, donde se muestra cómo las proteínas unidas a Ca^{2+} (p~Ca), en presencia de cantidades mayores de este catión, se asocian, aumentando así su tamaño medio:



donde $(p \sim Ca)_n$ indica agregados de $p \sim Ca$.

Posteriormente a este estudio, trabajos realizados por otros miembros del grupo de investigación demostraron que la presencia de hidrolizados de NaCAS bovinos obtenidos con el *pool* enzimático P45 aumenta la biodisponibilidad del Ca^{2+} debido, no sólo al aumento de la estabilidad coloidal de los ACC, sino también debido al aumento del número de sitios de unión al catión [137].

3.2. Proteólisis del NaCAS ovino

3.2.1. Estudios de los hidrolizados proteicos de NaCAS ovino obtenidos con PEP7

3.2.1.1. Obtención de los hidrolizados

Muestras de NaCAS ovino fueron sometidas a hidrólisis enzimática en medio alcalino utilizando el PEP7. La hidrólisis fue interrumpida a distintos tiempos (t_i) por desnaturalización térmica enzimática, tal como se explicó en la Sección 2.2.14.

Los perfiles electroforéticos revelaron que, para todos los t_i , la masa molecular de todos los hidrolizados fue menor a 6,5 kDa. Estos hidrolizados no permanecieron en el gel electroforético; en concordancia con estos resultados, los espectros de masa de los hidrolizados mostraron masas moleculares menores a 2 kDa (datos no mostrados).

Por otra parte, el grado de hidrólisis se incrementó a medida que aumentó el t_i , alcanzando 4,5 % a las 4 h (Figura 3.19). El grado de hidrólisis es una medida del contenido de enlaces peptídicos clivados en el sustrato por la acción enzimática, es decir, que cuanto mayor es el grado de hidrólisis, mayor el contenido de grupos amino liberados. Esto es de importancia ya que se han reportado que la actividad biológica de los hidrolizados depende del tipo de sustrato proteico, de la especificidad enzimática y de las condiciones de hidrólisis [78, 138].

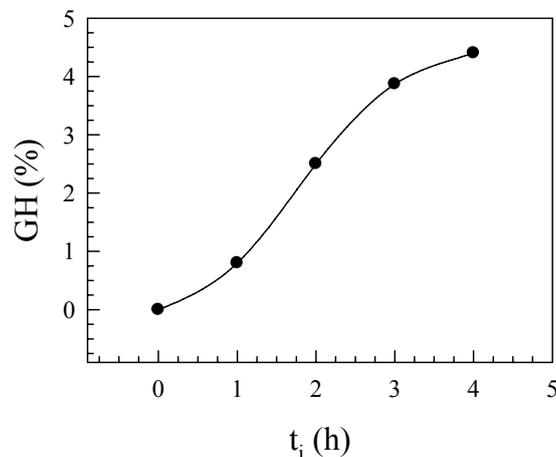
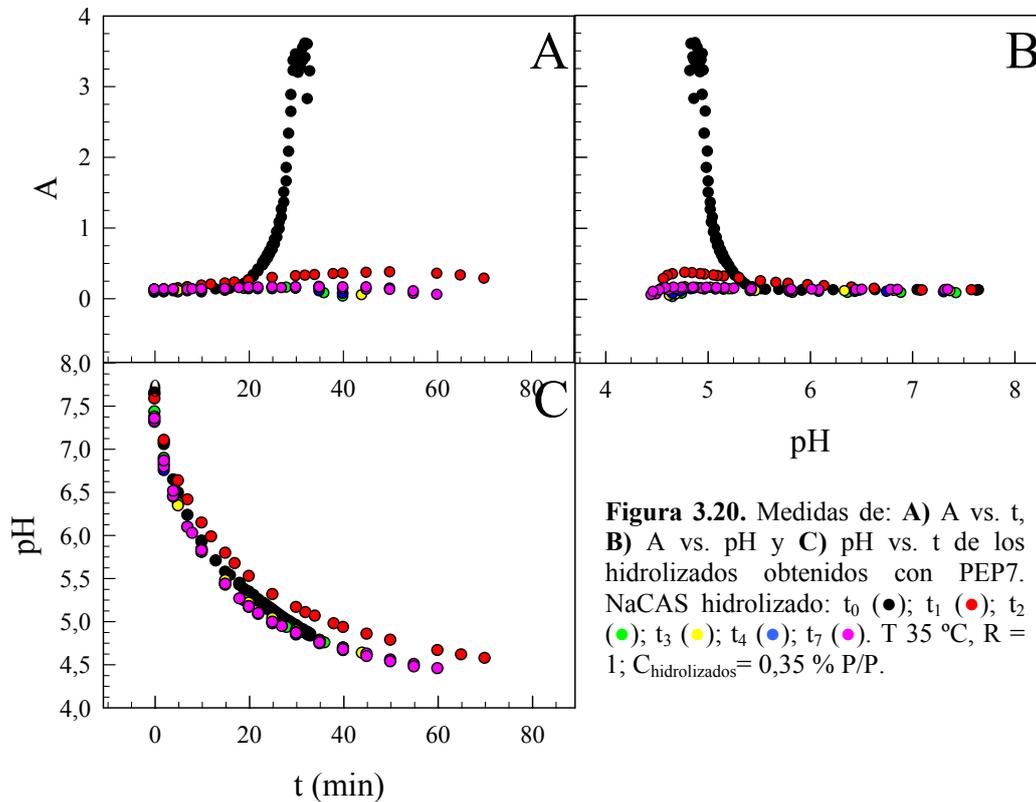


Figura 3.19. Grado de hidrólisis (GH, %) vs. tiempo de hidrólisis de hidrolizados de NaCAS ovino obtenidos con PEP7 a distintos tiempos (t_i , h).

Además, el grado de hidrólisis luego de 4 h no se modificó significativamente (datos no mostrados). Esto sugiere que el PEP7 no podría hidrolizar ulteriormente los enlaces que quedan dentro de los péptidos generados, un hecho que está directamente influenciado por la especificidad enzimática.

3.2.1.2. Evaluación del proceso de agregación ácida de los hidrolizados obtenidos con el PEP7

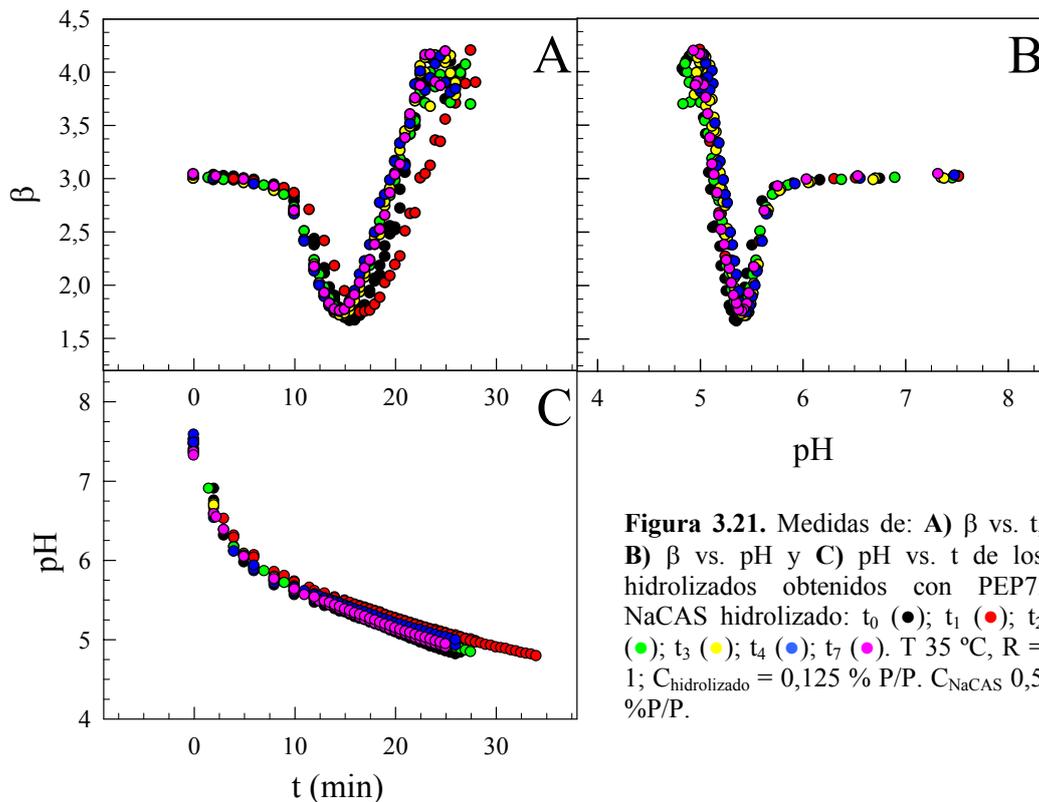
Se evaluó la capacidad de agregación de los hidrolizados obtenidos a tiempos t_0 , t_1 , t_2 , t_3 , t_4 y t_7 frente a la adición de GDL (Figura 3.20), según como se indica en la Sección 2.2.8.



Como puede observarse, los hidrolizados obtenidos a todos los t_i no conservaron la capacidad de agregar, excepto a t_0 (control), la muestra que no sufrió hidrólisis (Figuras 3.20.A y B). La ausencia de formación de agregados a partir de los hidrolizados t_{1-4} , detectables por turbidimetría, probablemente se deba al pequeño tamaño de las partículas que no forman agregados o generan pequeños agregados (más pequeños que la λ incidente) no detectados por medidas turbidimétricas. Por otra parte, no se detectaron cambios en la velocidad a la cual disminuye el pH (Figura 3.20.C).

3.2.1.3. Evaluación del proceso de agregación ácida de NaCAS ovino en presencia de sus hidrolizados

Se evaluó la capacidad de agregación de mezclas NaCAS ovino y sus hidrolizados obtenidos a t_0 , t_1 , t_2 , t_3 , t_4 y t_7 frente a la adición de GDL (Figura 3.21), según como se indica en la Sección 2.2.8.



En todos los casos estudiados pudo observarse la existencia de dos etapas bien definidas. En la primera etapa, que es más lenta, se observa un descenso del parámetro β a lo largo del tiempo; comportamiento que indicaría la existencia de un proceso de disociación y/o un cambio conformacional. Algunos autores sugieren que, en soluciones acuosas, el NaCAS bovino presenta un considerable nivel de autoasociación, formando micelas o submicelas [139-140]. Otros autores han sugerido que el NaCAS bovino se asocia formando pequeños agregados bien definidos con forma similar a una estrella, y con un número de agregación que depende de las condiciones del medio como T , pH o fuerza iónica. Estos agregados estarían formados por un centro hidrofóbico y una corona hidrofílica cargada [141]. Se podría asumir que el NaCAS ovino podría presentar un estado similar en solución acuosa. Por lo tanto, en esta primera etapa, el descenso del diámetro medio, estimado por los valores de β , puede deberse a la disociación de los agregados preexistentes en simultáneo con la formación de una gran cantidad de nuevos agregados de menor tamaño debido a la reducción de la carga neta de las partículas, lo que reduce su estabilidad electrostática y las hace más susceptibles a la floculación.

La segunda etapa, a valores de pH cercanos al punto isoeléctrico, cuando las partículas han perdido su estabilidad electrostática, revela la formación de agregados de gran tamaño

reflejada por un aumento brusco de β . Esta segunda etapa se inicia a un determinado tiempo (t_{ag}) y pH (pH_{ag}). Luego, al formarse una red o malla, el parámetro β permanece constante y su valor puede considerarse como la dimensión fractal (D_f) de los agregados formados. Como puede observarse en las Figuras 3.21.A y B, durante el proceso de agregación ácida del NaCAS ovino, la presencia de los hidrolizados no modificó apreciablemente la cinética de agregación del NaCAS (similar t_{ag}) ni su estabilidad electrostática (similar pH_{ag}). Tampoco se observaron modificaciones en la velocidad de descenso del pH (Figura 3.21.C). Adicionalmente, no se detectaron cambios significativos del grado de compactación de los agregados formados al final de la acidificación, evaluado a través de la D_f de dichos agregados.

3.2.1.4. Ensayos de actividades biológicas de los hidrolizados

3.2.1.4.1. Ensayo de la capacidad antioxidante

Se ha reportado que los péptidos e hidrolizados proteicos, obtenidos a partir de la proteólisis de diversas proteínas alimentarias, poseen actividad antioxidante. Dicha actividad puede proteger a los sistemas biológicos contra el daño vinculado al estrés oxidativo en casos de enfermedad. Estos péptidos e hidrolizados antioxidantes pueden emplearse para prevenir las reacciones de oxidación, tales como la peroxidación lipídica, que conducen al deterioro de los alimentos [138, 142].

La actividad antioxidante incluye la actividad de secuestro de los radicales $ABTS^{\cdot+}$ y $DPPH^{\cdot}$, el poder reductor y la habilidad para quelar al ión ferroso por parte de los hidrolizados.

Los resultados de la actividad de secuestro de los radicales $ABTS^{\cdot+}$ y $DPPH^{\cdot}$ de los hidrolizados obtenidos a tiempos t_0 , $t_{0,5}$, t_1 , t_2 , t_3 y t_4 se muestran en la Tabla 3.6, obtenidos según se indica en la Sección 2.2.17.1.

Tabla 3.6. Actividades antioxidantes de hidrolizados de NaCAS ovino obtenidos a distintos tiempos de acción enzimática de PEP7

Tiempo de hidrólisis (h)	Secuestro del radical $ABTS^{\cdot+}$ (%) ^a	Secuestro del radical $DPPH^{\cdot}$ (%) ^a
0	69,3 ± 0,1	27,5 ± 0,4
0,5	75,4 ± 1,4	20,7 ± 0,1
1	75,6 ± 0,5	30,9 ± 0,4
2	82,1 ± 1,5	23,4 ± 0,4
3	81,4 ± 1,2	27,9 ± 0,4
4	83,4 ± 0,8	20,9 ± 0,2

^a valores promedios ± desviación estándar

Como puede observarse, los hidrolizados presentaron mayores actividades antioxidantes en comparación al NaCAS sin hidrolizar (t_0), medidas con el método del radical $ABTS^{\cdot+}$. El radical $ABTS^{\cdot+}$ es reducido en presencia de antioxidantes donadores de hidrógeno o que pueden romper cadenas. Esta actividad antioxidante de los hidrolizados del NaCAS ovino aumentó hasta las 2 h de hidrólisis. Sin embargo, tiempos mayores de hidrólisis no incrementaron la reducción del radical $ABTS^{\cdot+}$ (Tabla 3.6).

El $DPPH^{\cdot}$ es un radical libre que acepta un electrón o un radical hidrógeno, convirtiéndose en una molécula estable. Por este motivo, se puede emplear como sustrato para evaluar la actividad antioxidante de los hidrolizados y péptidos. En el caso de la actividad secuestradora del radical $DPPH^{\cdot}$, los resultados variaron para los distintos t_i (Tabla 3.6), y no fue posible establecer una relación entre el t_i y la actividad secuestradora. Sin embargo, se observó una mayor actividad luego de 1 h de hidrólisis.

Si bien se ha reportado que la hidrólisis de las proteínas promueve un aumento en la actividad secuestradora de radical $DPPH^{\cdot}$ [77], esto no siempre se observa [126]. Más específicamente, hidrolizados de CN bovina obtenidos a partir de diversas enzimas proteolíticas mostraron bajos valores de actividad secuestradora en comparación con la caseína entera [143].

El distinto comportamiento por parte de los hidrolizados en los ensayos de secuestro de los radicales $ABTS^{\cdot+}$ y $DPPH^{\cdot}$ se podría explicar por la diferente estereoselectividad de los radicales, distintos péptidos presentes en la muestra capaces de reaccionar y extinguir diferentes radicales y distintas estequiometrías de reacción entre los compuestos antioxidantes en los hidrolizados y los radicales $ABTS^{\cdot+}$ y $DPPH^{\cdot}$ [144]. Además, la habilidad antioxidante de las CN y de péptidos derivados de las mismas no se basa totalmente en la capacidad para donar hidrógeno y diferencias en la eficacia de secuestro se pueden atribuir a la solubilidad y difusividad de los radicales [143]. Por lo tanto una mayor actividad evidenciada por el método $ABTS$ no necesariamente implica un incremento en la habilidad para secuestrar radicales $DPPH^{\cdot}$.

El resultado de la determinación del poder reductor de los hidrolizados obtenidos a tiempos t_0 , $t_{0,5}$, t_1 , t_2 , t_3 y t_4 puede observarse en la Tabla 3.7.

El poder reductor de los hidrolizados de NaCAS ovino alcanzó su valor máximo luego de 1 h de hidrólisis, decreciendo posteriormente. Este ensayo se basa en la habilidad de un compuesto para reducir al complejo Fe^{3+} /ferrocianuro a la forma ferrosa (Fe^{2+}) [145]. Por lo tanto, el poder reductor de los hidrolizados de proteínas indican que ellos pueden actuar como dadores de electrones, reducir los intermediarios oxidados de los procesos de peroxidación de lípidos y contribuir a la actividad antioxidante [146].

Tabla 3.7. Poder reductor de hidrolizados de NaCAS ovino obtenidos a distintos tiempos de acción enzimática de PEP7.

Tiempo de hidrólisis (h)	Poder reductor (A a 700 nm) ^a
0	0,607 ± 0,016
0,5	0,755 ± 0,005
1	1,094 ± 0,007
2	0,824 ± 0,055
3	0,780 ± 0,072
4	0,487 ± 0,011

^a valores promedio ± desviación estándar

El hierro actúa como un catalizador para la generación de radicales hidroxilo a través de la reacción de Fenton [145], de esta forma contribuye potencialmente a enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Además, los metales de transición podrían estimular la peroxidación de lípidos en los alimentos promoviendo de esta forma la rancidez [138]. Como consecuencia, la formación de quelatos de iones metálicos por hidrolizados proteicos puede contribuir a la actividad antioxidante. Se ha reportado la acción quelante de metales por parte de las caseínas y péptidos de las caseínas [142-143]. Los resultados de la determinación de la actividad quelante de Fe²⁺ de los hidrolizados (3,5 g.L⁻¹) obtenidos a tiempos t₀, t_{0,5}, t₁, t₂, t₃ y t₄ se observan en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Habilidad para quelar al Fe²⁺ de los hidrolizados de NaCAS ovino obtenidos a distintos tiempos de acción enzimática de PEP7

Tiempo de hidrólisis (h)	Actividad quelante de Fe ²⁺ (%) ^a
0	76,2 ± 0,02
0,5	83,30 ± 0,02
1	77,40 ± 0,01
2	72,60 ± 0,06
3	72,20 ± 0,07
4	70,80 ± 0,03

^a valores promedios ± desviación estándar

El hidrolizado de NaCAS ovino obtenido a las 0,5 h exhibió un 83,3 % de habilidad para quelar al Fe²⁺ en comparación con el hidrolizado control (t₀; 76%); mientras que mayores tiempos de hidrólisis resultaron en una disminución de la habilidad para quelar al metal. Se ha

reportado, para un aislado de proteína de arveja hidrolizado con termolisina, una habilidad quelante del 95 % de iones metálicos a 1 g.L^{-1} [145] y que la habilidad quelante de hidrolizados de hemoglobina porcina (5 g.L^{-1}) variaban entre 8 y 61 %, siendo estos valores siempre menores que los de la hemoglobina no hidrolizada [126].

Por lo tanto, el NaCAS ovino y sus hidrolizados podrían haber interferido con la formación del complejo Fe^{2+} /ferrozina mediante la captura de iones Fe^{2+} antes que la ferrozina, sugiriendo que la capacidad antioxidante también podría estar relacionada con su capacidad para unir hierro [146].

3.2.1.4.2. Actividad antimicrobiana

Según la Sección 2.2.17.2 y 2.2.17.3 se determinó la actividad antibacteriana y antifúngica de los hidrolizados obtenidos a tiempos t_0 , $t_{0,5}$, t_1 , t_2 , t_3 y t_4 (Tablas 3.09 y 3.10).

Sólo el hidrolizado obtenido a las 3 h mostró actividad antibacteriana contra *Bacillus cereus* y *Corynebacterium fimi*. Las bacterias inhibidas, particularmente el *B. cereus*, son causantes de intoxicaciones alimentarias y del deterioro de los alimentos, y también son patógenos oportunistas [147]. Varios autores han reportado el efecto antimicrobiano de péptidos obtenidos por hidrólisis de α_s -CN bovina y ovina, así como de caseinato proveniente de leche humana, por acción de diversas enzimas [148-150]. Usualmente, los péptidos antimicrobianos derivados de las proteínas lácteas poseen carácter anfifílico y catiónico, lo que parece ser significativo para su mecanismo de acción dado que se ha propuesto que la etapa inicial de formación de poros en la membrana bacteriana, que conduce a la muerte celular, estaría dada por la unión electrostática entre los péptidos y la membrana cargada negativamente [151]. En general, estos péptidos muestran un amplio rango de actividad frente a microorganismos de importancia para la salud y/o el deterioro de los alimentos. En el caso de los péptidos obtenidos con el PEP7, solo fueron inhibidas bacterias Gram-positivas (Tabla 3.10). Dado que la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas es estructural y funcionalmente más compleja que la de las bacterias Gram-positivas, estas diferencias en la composición de la membrana bacteriana podría tener implicancias para el modo de acción y la especificidad bacteriana de estos hidrolizados antibacterianos.

Tabla 3.09. Actividades antibacterianas de hidrolizado de NaCAS ovino obtenido a las 3 h de hidrólisis (t₃) por acción enzimática de PEP7.

Microorganismos indicadores	Zona de inhibición (mm) ^a
Bacterias Gram positiva	
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15131	- ^b
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9634	9,3
<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547	11,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1901	-
Bacterias Gram negativa	
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-

^a valores obtenidos del promedio de tres mediciones independientes

^b sin inhibición

Han sido reportados pocos estudios sobre actividad antifúngica de péptidos o hidrolizados de proteínas. El indicador fúngico más común es la *Candida albicans*, y la utilización de hongos filamentosos como cepa de prueba ha sido poco reportada [151]. En este caso, sólo el hidrolizado obtenido a las 3 h mostró actividad antifúngica contra *Penicillium expansum* y *Aspergillus fumigatus* (Tabla 3.10), los cuales pueden ocasionar enfermedades en plantas y humanos. En consecuencia, la inhibición de hongos filamentosos podría representar una aplicación adicional como un nuevo agente antifúngico.

La búsqueda de fungicidas alternativos es un tópico de gran interés debido a las desventajas asociadas con la síntesis química de los mismos, tales como costos elevados, contaminación del medioambiente e inducción de resistencia en patógenos [152].

Tabla 3.10. Actividades antifúngicas de hidrolizado de NaCAS ovino obtenido a las 3 h de hidrólisis (t₃) por acción enzimática de PEP7.

Microorganismos indicadores	Zona de inhibición (mm) ^a
Levaduras	
<i>Candida albicans</i>	- ^b
Hongos filamentosos	
<i>Penicillium expansum</i>	9,0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	10,0
<i>Fusarium oxysporum</i> ssp. <i>lycopersici</i>	-

^a valores obtenidos del promedio de tres mediciones independientes

^b sin inhibición

Las diversas actividades biológicas que han presentado los hidrolizados de NaCAS ovino obtenidos con PEP7 y el hecho que la incorporación de dichos hidrolizados en muestras de NaCAS no han producido modificaciones significativas en los agregados ácidos, son resultados prometedores para la utilización de estos hidrolizados en la elaboración de productos lácteos fermentados a partir de leche de oveja.

3.2.2. Estudios de los hidrolizados proteicos de NaCAS ovino obtenidos con PEP45

3.2.2.1. Obtención de los hidrolizados

Muestras de NaCAS ovino fueron sometidas a hidrólisis enzimática en medio alcalino utilizando PEP45. La hidrólisis fue interrumpida a distintos tiempos por desnaturalización térmica de la enzima, tal como se explica en la Sección 2.2.14. El GH se incrementó casi linealmente desde t_0 a t_2 (3,8 %), y luego la velocidad de hidrólisis se redujo alcanzando 5,5 % a t_7 , indicando la disminución de la accesibilidad de los enlaces peptídicos para ser escindidos dentro del substrato (Figura 3.22.A). El GH a t_7 es comparable al GH de la CN de yak proteolizada con papaína [153] y al de la α -CN bovina hidrolizada con quimotripsina o una proteasa de *Streptomyces griseus* [148]. El GH a t_3 - t_4 es semejante al del caseinato ovino hidrolizado por PEP7.

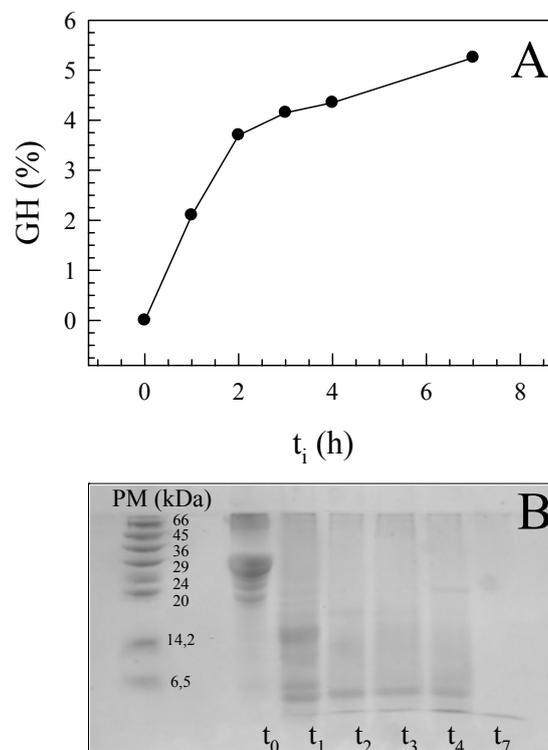


Figura 3.22. A) Grado de hidrólisis (GH, %) vs. tiempo de hidrólisis (t_i , h) y **B)** Electroforesis en SDS-PAGE de los hidrolizados de NaCAS ovino obtenidos con PEP45.

En la Figura 3.22.B se muestra el perfil electroforético de dichos hidrolizados. Se puede observar que la extensión de la hidrólisis aumenta hasta las dos horas de incubación, la desaparición de las bandas de mayor masa molecular (~ 25 kDa, t_0) a t_1 y la concomitante aparición de bandas de menor masa molecular alcanzándose, a los tiempos mayores, masas moleculares menores a 6,5 kDa.

3.2.2.2. Estudio conformacional de los hidrolizados a través de espectros de absorción y de emisión de la fluorescencia intrínseca de los cromóforos proteicos

Se realizaron espectros de emisión de IF (Figura 3.23) y de absorción de los hidrolizados de NaCAS (Figura 3.24).

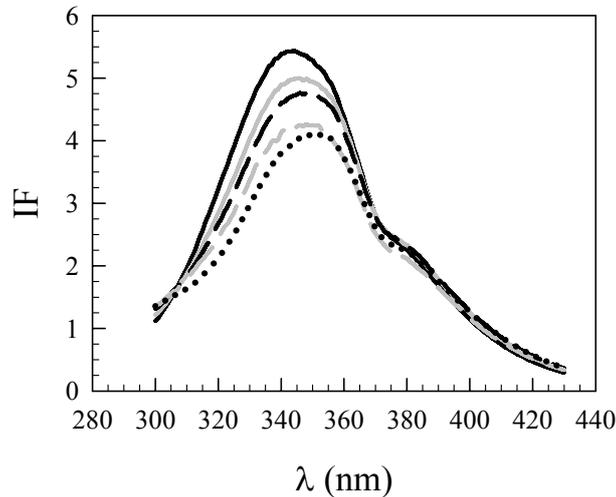


Figura 3.23. Espectros de emisión de fluorescencia de los hidrolizados obtenidos con la enzima proteolítica P45. NaCAS hidrolizado: t_0 (—); t_1 (— · —); t_2 (— — —); t_3 (— — —); t_4 (·····). Rango $\lambda_{em} = 300-430$ nm, $\lambda_{exc} = 286$ nm, T 35 °C y concentración hidrolizados: 0,1 % P/P.

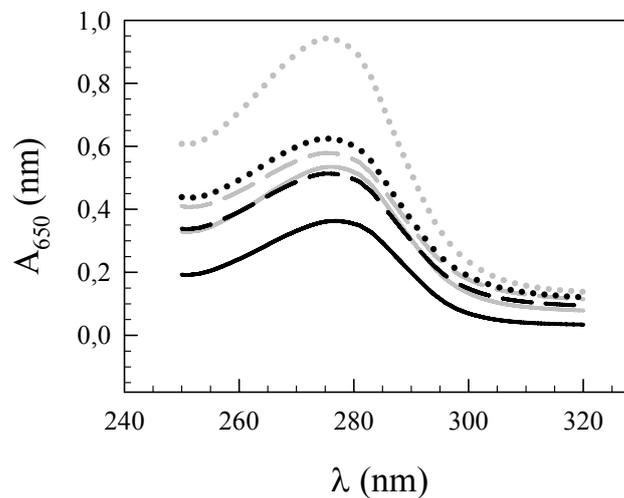


Figura 3.24. Espectros de absorción de fluorescencia de los hidrolizados obtenidos con la enzima proteolítica P45. NaCAS hidrolizado: t_0 (—); t_1 (— · —); t_2 (— — —); t_3 (— — —); t_4 (·····) y t_7 (·····). Rango $\lambda_{em} = 250-320$ nm, T 35 °C y concentración hidrolizados: 0,1 % P/P.

Se observó un corrimiento hacia la banda roja del espectro de emisión y una disminución de la IF intrínseca de los hidrolizados a medida que aumenta el tiempo de hidrólisis, lo cual

puede vincularse a cambios conformacionales en los alrededores de los fluoróforos intrínsecos de los péptidos. Se ha descartado la posibilidad de pérdida de fluoróforos durante la proteólisis dado que los precipitados resolubilizados mostraron intensidad de fluorescencia despreciable (datos no mostrados).

Por otra parte, se evidenció un aumento de la absorbancia de la fluorescencia de los hidrolizados a tiempos mayores de hidrólisis. Ambos resultados sugieren un cambio de polaridad del entorno de los fluoróforos intrínsecos (Trp y/o Tyr) hacia medios más polares, lo que estaría vinculado al aumento de exposición de dichos grupos al medio. En particular, el pico de absorbancia parece corresponder al pico de la Tyr, el cual está localizado entre 275 y 282 nm [154].

3.2.2.3. Hidrofobicidad superficial

Se determinó la hidrofobicidad superficial (S_H) de los hidrolizados obtenidos a distintos tiempos según la Sección 2.2.7.2. Los resultados se muestran en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11. Valores de S_H de los hidrolizados de NaCAS ovino obtenidos a distintos tiempos (t_i) de hidrólisis con PEP45. T = 35 °C

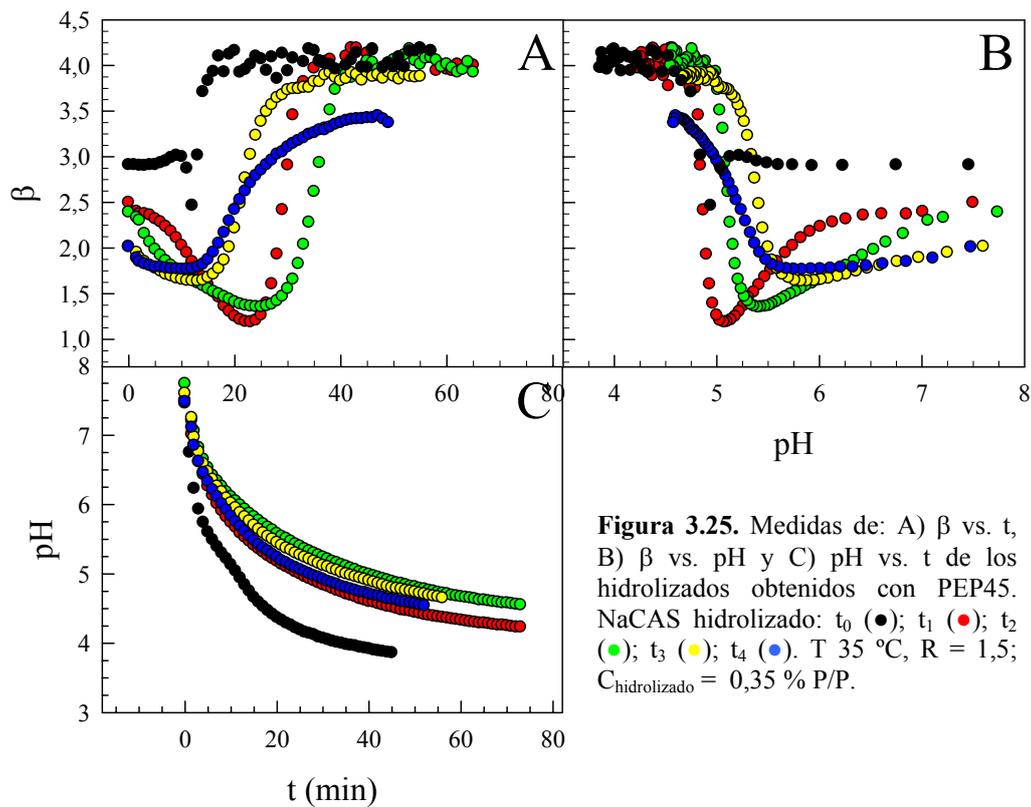
Tiempo de hidrólisis (h)	S_H (mL.g ⁻¹) ^a
0	0,055 ± 0,008
1	0,047 ± 0,007
2	0,042 ± 0,005
3	0,107 ± 0,002
4	0,233 ± 0,006
7	0,390 ± 0,003

^a valores promedios ± desviación estándar

Los valores de S_H permanecieron prácticamente constantes para los hidrolizados obtenidos hasta 2 h de hidrólisis y se incrementaron para tiempos mayores. Esto indicaría una mayor exposición de grupos hidrofóbicos en la superficie de los hidrolizados obtenidos a tiempos ≥ 3 h de hidrólisis. En este sentido, las proteasas tipo subtilisina, que usualmente muestran preferencia por los residuos aromáticos y/o hidrofóbicos del sitio P₁ del enlace peptídico escindible (P1'-P1) en el substrato, están entre las enzimas proteolíticas producidas por el *Bacillus* sp. P45 [155].

3.2.2.4. Evaluación del proceso de agregación ácida de los hidrolizados obtenidos con PEP45

Se evaluó la capacidad de agregación de los hidrolizados obtenidos frente a la adición de GDL (Figura 3.25). Los resultados de los gráficos 3.25.A y 3.25.B muestran que los hidrolizados conservan la capacidad de agregar y que el proceso de acidificación revela dos etapas bien definidas, como ya se mencionara previamente para la agregación del NaCAS ovino con la PEP7 (Sección 3.2.1.3).



De los perfiles de agregación también puede inferirse que el t_{ag} para los hidrolizados es mayor que el t_{ag} para el NaCAS ovino sin hidrolizar (t_0), y que los t_{ag} de los hidrolizados t_3 y t_4 fueron menores que los correspondientes a los hidrolizados t_1 and t_2 (Figura 3.25.A). Este hecho puede estar relacionado al incremento de S_H observado para los hidrolizados obtenidos a tiempos de proteólisis más largos (Tabla 3.11), lo que favorece las interacciones hidrofóbicas atractivas y conduce a la agregación entre partículas.

El pH_{ag} de los hidrolizados t_{1-4} es mayor que el del NaCAS no hidrolizado (Figura 3.25.B), indicando que los hidrolizados son menos estables en solución. Además, una disminución de la velocidad de descenso del pH para todos los hidrolizados (Figura 3.25.C) y el mayor t_{ag}

detectado para los mismos estaría vinculado a un incremento de la capacidad buffer de dichos hidrolizados.

Los valores de D_f de los agregados formados al final del proceso de agregación se muestran en la Tabla 3.12, donde puede inferirse que el grado de compactación de los agregados de las muestras t_1 y t_2 fue similar al de los agregados obtenidos a partir del NaCAS sin hidrolizar, pero disminuye a tiempos de hidrólisis más largos, especialmente a t_4 .

Tabla 3.12. Valores de Dimensión Fractal (D_f) de los hidrolizados de NaCAS ovino obtenidos a distintos tiempos (t_i) de hidrólisis con PEP45. T = 35 °C

Tiempo de hidrólisis (h)	D_f^a
0	4,10 ± 0,10
1	4,10 ± 0,08
2	4,00 ± 0,10
3	3,88 ± 0,03
4	3,42 ± 0,02

^a valores promedio ± desviación estándar.

Por otro lado, el tamaño medio de las partículas iniciales, estimado por los valores de β antes de la adición de la GDL, disminuye a medida que el tiempo de hidrólisis aumenta, y en concordancia con la disminución de la masa molecular observado en la Figura 3.22.B. Para verificar la correlación entre el parámetro β y el tamaño medio de las partículas se realizaron mediciones de los diámetros hidrodinámicos mediante DLS, obteniéndose una buena correlación lineal ($R=0,9082$, $P<0,0018$) (datos no mostrados), permitiendo esto determinar que un cambio de 0,1 en el parámetro β corresponde a una variación de 16 nm en el tamaño medio. Resultados previos indican que la D_f depende del estado inicial de las partículas coloidales de NaCAS en suspensión, relacionado a la composición en CN, tamaño medio, nivel de autoasociación o grado de compactación de las partículas primarias, entre otros [156].

3.2.2.5. Evaluación del proceso de agregación ácida de NaCAS ovino en presencia de sus hidrolizados obtenidos con PEP45

Con el objetivo de evaluar si la presencia de los hidrolizados afectan la cinética de agregación del NaCAS ovino, se ensayó la agregación de mezclas NaCAS ovino/hidrolizados t_i (4:1) en función del tiempo y del pH luego de la adición de GDL (Figura 3.26). El mismo

comportamiento en dos etapas observado para la agregación de los hidrolizados (Figura 3.26) se determinó para las mezclas NaCAS/hidrolizados.

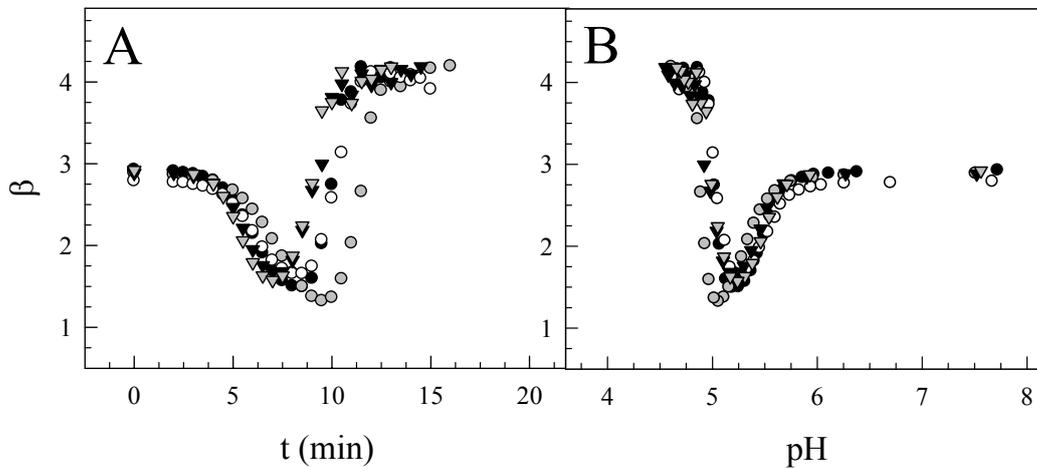


Figura 3.26. A) Parámetro β vs. t y B) β vs. pH durante la agregación ácida de las mezclas NaCAS/hidrolizados t_i (4:1), luego de la adición de GDL, a 35 °C con $R = 2$. Concentración total de NaCAS 0,5 % P/P y de los hidrolizados 0,125 % P/P; t_0 (●), t_1 (○), t_2 (○), t_3 (▼) y t_4 (▼). Hidrolizados obtenidos con PEP45.

Se observaron cambios en los valores de t_{ag} en presencia de los hidrolizados sólo para la mezcla NaCAS/hidrolizado t_1 , relacionado probablemente con la disminución de pH_{ag} . Por otro lado, no se observaron cambios en la velocidad de descenso del pH (datos no mostrados). Además no se observaron cambios significativos en el grado de compactación de los agregados formados al final del proceso de acidificación.

3.2.2.6. Ensayos de propiedades biológicas de hidrolizados de NaCAS ovino obtenidos con PEP45

3.2.2.6.1. Ensayo de la capacidad antioxidante

La actividad antioxidante de los hidrolizados obtenidos a tiempos t_0 , t_1 , t_2 , t_3 y t_4 se estudio utilizando el radical $ABTS^{\cdot+}$ según lo indicado en la Sección 2.2.14.1.1 (Tabla 3.13).

Como puede observarse, la muestra de NaCAS ovino sin hidrolizar (t_0) mostró actividad antioxidante, hecho que ya ha sido reportado previamente [157]. Por otra parte, la máxima actividad secuestradora de radical $ABTS^{\cdot+}$ se obtuvo a las 3 h de hidrólisis (t_3), siendo 12,5 % mayor que para t_0 .

Tabla 3.13. Actividad secuestradora del radical ABTS^{·+} de los hidrolizados de NaCAS ovino obtenidos a distintos tiempos de acción enzimática de PEP45

Tiempo de hidrólisis (h)	Secuestro del radical ABTS ^{·+} (%) ^a
0	53,57 ± 0,65
1	57,86 ± 0,74
2	57,27 ± 0,14
3	66,08 ± 0,95
4	64,50 ± 1,06

^a valores promedios ± desviación estándar.

Estos resultados son similares a los obtenidos para los hidrolizados de NaCAS ovino obtenidos con PEP7, los cuales mostraron máxima actividad antioxidante luego de las 2 h de hidrólisis resultando en un incremento en un 12,8 % en comparación a su correspondiente NaCAS sin hidrolizar. El efecto general positivo de la proteólisis sobre la actividad antioxidante del NaCAS ovino sugiere la liberación de secuencias peptídicas previamente inactivas de la estructura primaria proteica [77].

La incorporación de estos hidrolizados en productos alimenticios podría servir a diversos propósitos tales como incrementar el valor nutricional de los mismos, prevenir las reacciones de oxidación durante el almacenamiento y la liberación de péptidos antioxidantes que prevengan el daño oxidativo [81, 157].

3.2.2.6.2. Actividad antimicrobiana

Se investigó la capacidad de los hidrolizados de NaCAS ovino, obtenidos a tiempos t_0 , t_1 , t_2 , t_3 y t_4 , de inhibir el crecimiento de bacterias según la Sección 2.2.14.2.

Sólo para el hidrolizado obtenido a t_1 se observó inhibición del crecimiento de *S. enteritidis*, *E. coli*, *C. fimi*, y *L. monocytogenes* (Figura 3.27) los cuales son microorganismos relacionados con enfermedades transmitidas por los alimentos [158]. Por lo tanto, estos péptidos antimicrobianos podrían ser de útil aplicación debido a la inhibición de microorganismos patogénicos o que deterioran alimentos, agregando de esta forma calidad y seguridad en los productos alimenticios.

Como se mencionó para el hidrolizado de NaCAS ovino obtenido con la PEP7 a las 3 h de hidrólisis (t_3), dicho hidrolizado inhibió las bacterias Gram positivas *B. cereus* ATCC 9634 y *C. fimi* NCTC 7547. No obstante, los resultados con PEP45 evidenciaron la inhibición de

bacterias Gram positivas y Gram negativas (Figura 3.27), en forma similar a lo reportado para hidrolizados de α -CN bovina obtenidos con quimotripsina [148]. Específicamente, productos de hidrólisis de α_{s2} -CN mostraron actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo *E. coli* y *Listeria innocua* [150].

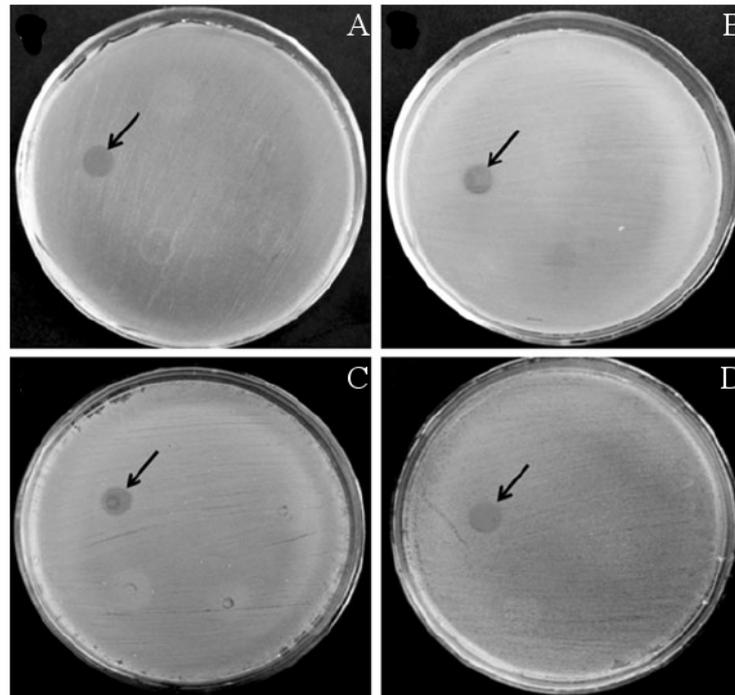


Figura 3.27. Inhibición del crecimiento de **A)** *Salmonella enteritidis*, **B)** *Escherichia coli*, **C)** *Corynebacterium fimi*, y **D)** *Listeria monocytogenes* por el hidrolizado de NaCAS ovino obtenido a una hora de hidrólisis (t_1) con PEP45. Las flechas indican halos de inhibición.

Con respecto a la actividad antifúngica, solo el hidrolizado obtenido a t_1 evidenció una inhibición del crecimiento fúngico (datos no mostrados). Fueron inhibidos por el hidrolizados los hongos fitopatógenos: *F. oxysporum* y *P. expansum* y también el hongo *A. fumigatus*. Estos resultados también podrían tener implicaciones prácticas, debido a que algunas cepas de *F. oxysporum* son responsables en muchas plantas de severos marchitamientos vasculares o de enfermedades de pudrición de la raíz. Por ejemplo, el marchitamiento causado por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* es una de las enfermedades más devastadoras en plantas de tomate [159]. Además, *P. expansum* es considerado una de las principales causas del deterioro postcosecha de peras y manzanas y es frecuentemente aislado en una gran variedad de frutas [160]. Adicionalmente, *A. fumigatus* es la especie más frecuente que causa enfermedad en pacientes fundamentalmente inmunodeprimidos.

Estos resultados sugieren la posibilidad de la utilización de PEP45 para la obtención de hidrolizados de NaCAS ovino que posean actividad antioxidante y antimicrobiana. La cinética de la agregación ácida y también la D_f de los agregados obtenidos para las mezclas NaCAS/hidrolizado fueron similares en comparación al NaCAS sin hidrolizar, indicando esto la posibilidad de inclusión de los hidrolizados en una matriz de NaCAS ovino sin alterar significativamente los perfiles de la agregación. Aunque la D_f puede relacionarse a las propiedades reológicas [161], se necesitaría realizar estudios adicionales para evaluar el efecto de la incorporación de los hidrolizados sobre la estructura y textura de los geles ácidos.

3.3. Proteólisis del NaCAS bovino

3.3.1. Estudios de los hidrolizados proteicos de NaCAS bovino obtenidos con PEP7

3.3.1.1. Obtención de los hidrolizados proteicos

Se realizó la hidrólisis enzimática en medio alcalino, utilizando PEP7, NaCAS bovino en solución acuosa. Esta proteólisis fue interrumpida a distintos tiempos por desnaturalización térmica del PEP7, tal como se explicó en la Sección 2.2.13.

La hidrólisis del NaCAS bovino con PEP7 se realizó hasta 7 h, determinándose en los sobrenadantes de cada muestra el GH alcanzado (Figura 3.28). Luego de 7 h de proteólisis, el GH fue de 8,2%, siendo mayor la velocidad de hidrólisis durante las primeras cuatro horas, luego de lo cual disminuyó. Dado que el GH es una medida del número de enlaces peptídicos escindidos, este descenso de la velocidad de hidrólisis indica una menor disponibilidad de enlaces peptídicos escindibles. Un comportamiento similar se observó para la hidrólisis del NaCAS bovino con el PEP45 [162]. Sin embargo, la pérdida de grupos amino, es decir, de enlaces peptídicos escindidos, fue menor para el NaCAS ovino al ser hidrolizado por el PEP7, lo cual podría reflejar la heterogeneidad del sustrato (caseína) entre ambas especies [149].

Estos resultados fueron corroborados por SDS-PAGE ya que en los gels se observó que los hidrolizados no permanecieron en el gel de corrida, aún trabajando con elevadas concentraciones de poliacrilamida, de donde se puede inferir que la masa molecular de los hidrolizados obtenidos a todos los tiempos ensayados es menor a 6,5 kDa (masa molecular más baja del marcador).

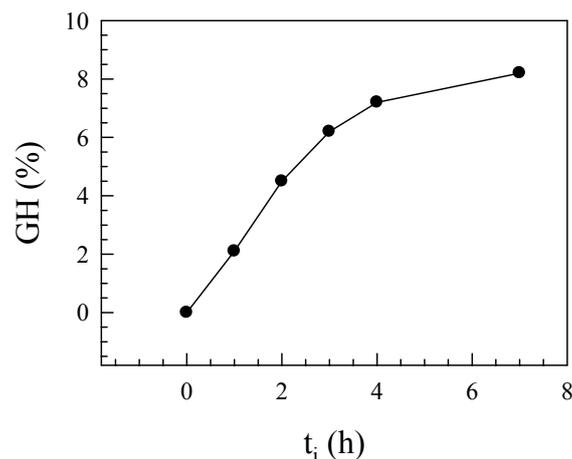


Figura 3.28. Grado de hidrólisis (GH, %) vs. tiempo de hidrólisis de hidrolizados de NaCAS bovino obtenidos con PEP7 a distintos tiempos (t_i, h).

Adicionalmente los resultados de espectrometría de masa confirmaron que la mayor proporción de masas moleculares de hidrolizados obtenidos hasta las 4 h de hidrólisis fue menor a 3 kDa [163].

3.3.1.2. Estudio conformacional de los hidrolizados a través de espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de los cromóforos proteicos

Se realizaron espectros de emisión de IF (Figura 3.29) de los hidrolizados del NaCAS bovino obtenidos con PEP7.

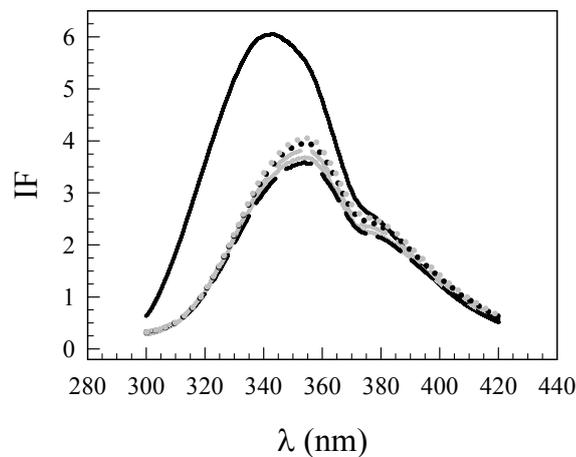
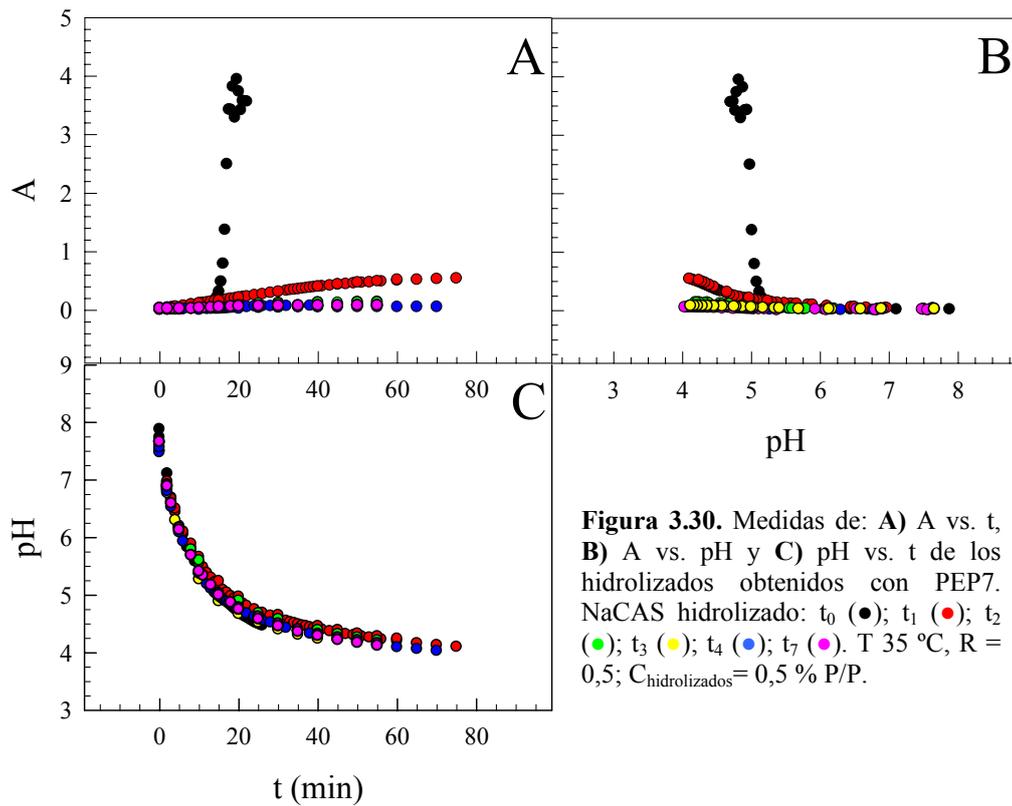


Figura 3.29. Intensidad de fluorescencia (IF) de hidrolizados de NaCAS bovino obtenidos por hidrólisis con PEP7 a diferentes tiempos (t_i): t_0 (—); t_1 (—); t_2 (—); t_3 (—); t_4 (•••••) y t_7 (*•••••). $C_{\text{hidrolizado}} = 0,1 \text{ \%P/P}$, rango $\lambda_{\text{em}} = 300\text{-}420 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 286 \text{ nm}$ y $T = 35 \text{ }^\circ\text{C}$.

Se puede inferir que la hidrólisis causa un corrimiento hacia la banda roja en el espectro de emisión de fluorescencia y un descenso de la IF, lo que puede deberse a un cambio conformacional y, como consecuencia, un incremento de la polaridad en los alrededores de los fluoróforos intrínsecos proteicos en los péptidos (Trp y Tyr). Previamente se verificó que durante la proteólisis enzimática no hubiera pérdida de dichos fluoróforos (datos no mostrados).

3.3.1.3. Evaluación del proceso de agregación ácida de los hidrolizados obtenidos con PEP7

Se evaluó la capacidad de agregación de los hidrolizados obtenidos frente a la adición de GDL (Figura 3.30). En forma semejante a lo observado para los hidrolizados de NaCAS ovino con PEP7, tampoco se verificó agregación de los hidrolizados de NaCAS bovino con PEP7.



Como puede observarse, sólo agregaron las muestras t₀, que son las que no sufrieron hidrólisis. La ausencia de formación de agregados a partir de los hidrolizados t₁₋₇ detectables por esta técnica, probablemente se deba al pequeño tamaño medio de los mismos que no pueden formar o solo generan agregados pequeños (menores que la λ incidente) no detectados por medidas de turbidez. Por otra parte, tampoco se detectaron cambios en la velocidad de descenso de pH (Figura 3.30.C).

3.3.1.4. Evaluación del proceso de agregación ácida de NaCAS bovino en presencia de sus hidrolizados obtenidos con PEP7

Se estudió la capacidad de agregación de mezclas NaCAS bovino y sus hidrolizados obtenidos a tiempos t₀, t₁, t₂, t₃, t₄ y t₇ frente a la adición de GDL con el objetivo de evaluar si la incorporación de hidrolizados con actividad biológica modifica la cinética del proceso de agregación del NaCAS y/o el grado de compactación de los agregados formados (Figura 3.31).

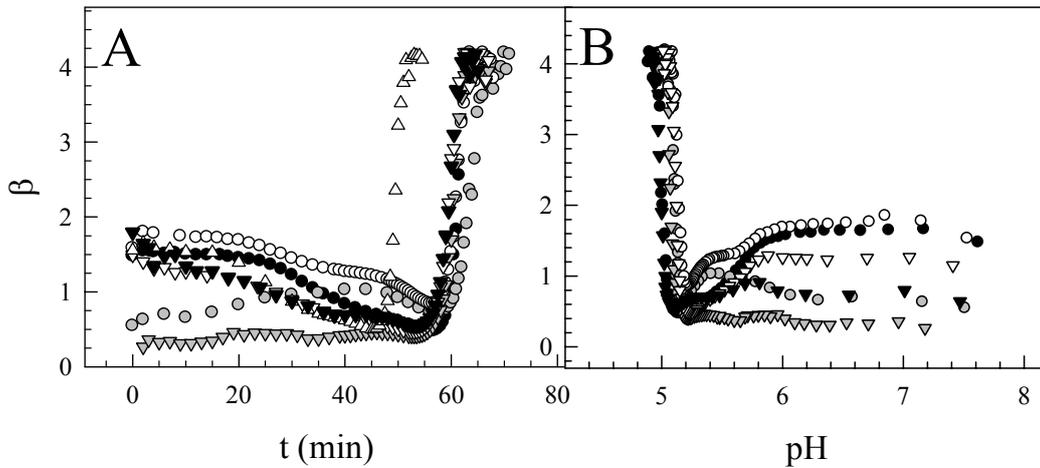


Figura 3.31. A) Variaciones del parámetro β en función del tiempo y B) β en función del pH, luego de la adición de GDL; t_0 (●); t_1 (◐); t_2 (○); t_3 (▼); t_4 (▽) y t_7 (▽). T 35 °C. R = 0,5. Concentraciones totales: NaCAS 0,5 % P/P e hidrolizado t_1 0,125 % P/P.

Durante el proceso de agregación ácida del NaCAS, la presencia de los hidrolizados no modificó el valor de pH al cual comienza la agregación, es decir, no afectó apreciablemente la estabilidad electrostática del NaCAS. Tampoco se observaron modificaciones en la velocidad de descenso del pH. Sin embargo, se observó un incremento del tiempo al cual comienza la agregación, aunque no se detectaron cambios significativos en el grado de compactación de los agregados formados al final de la acidificación en presencia de los hidrolizados.

Teniendo en cuenta estos resultados, se consideró de interés evaluar el comportamiento de las mezclas en presencia de GDL, pero a concentraciones a las cuales el descenso de pH conduzca a la formación de un gel. Para ello, se realizaron determinaciones de las propiedades reológicas y de la microestructura de los geles.

3.3.1.5. Efecto de la adición de los hidrolizados sobre las propiedades reológicas de los geles ácidos de NaCAS bovino

Se realizaron ensayos reológicos oscilatorios para determinar las propiedades viscoelásticas de los geles ácidos durante su formación y una vez alcanzado el equilibrio, en ausencia y en presencia de los hidrolizados, para determinar si la presencia de los mismos produce alguna modificación en la cinética de gelación del NaCAS (t_g y pH_g) y/o la elasticidad de los geles ($G'_{m\acute{a}x}$ y $\tan \delta$). Los resultados se muestran en la Tabla 3.14.

Tabla 3.14. Tiempos de gelificación (t_g), pH del comienzo de la formación del gel (pH_g), G'_{max} y $\tan \delta$ de geles ácidos de mezclas NaCAS bovino/hidrolizados, con los hidrolizados obtenidos a diferentes tiempos de hidrólisis (t_i). $C_{NaCAS} = 3\%P/P$, $C_{hidrolizado} = 0,75\%P/P$, $R = 0,5$ y $T = 35\text{ }^\circ\text{C}$.

Tiempo de hidrólisis (h)	t_g (min) ^a	pH_g ^a	G'_{max} ^a	$\tan \delta$ ^a
0	22,4 ± 0,1	4,92 ± 0,02	57 ± 6	0,36 ± 0,01
1	22,4 ± 0,2	4,97 ± 0,03	54 ± 3	0,34 ± 0,02
2	22,9 ± 0,2	4,93 ± 0,01	48 ± 5	0,33 ± 0,02
3	25,9 ± 0,5	4,91 ± 0,01	40 ± 4	0,32 ± 0,01
4	23,7 ± 0,3	4,93 ± 0,01	27 ± 5	0,31 ± 0,01

^a valores promedios ± desviación estándar

Los resultados evidenciaron que no ocurrieron mayores cambios en la cinética del proceso, ya que no se observaron diferencias significativas en los parámetros t_g y pH_g . Sin embargo, el valor de $G'_{m\acute{a}x}$ disminuyó en la presencia de los hidrolizados, especialmente para t_4 . Luego del t_g , el incremento de G' refleja el aumento de contacto entre la partículas de NaCAS con la consiguiente fusión de partículas, y el subsecuente reordenamiento interparticular debido a la reversibilidad de las uniones, lo que resulta en más enlaces por unión o cruce, y en más uniones o cruces, lo que a su vez incrementa G' [164]. Por lo tanto, la presencia de los hidrolizados podría dificultar estos reordenamientos entre partículas, conduciendo a la disminución del carácter elástico de los geles. Por otra parte, los valores de $\tan \delta$ indican que, aún así, siempre predomina el carácter elástico sobre el viscoso.

3.3.1.6. Evaluación de la microestructura de los geles mixtos obtenidos

En la Figura 3.32 se muestran imágenes representativas de geles ácidos de mezclas de NaCAS/hidrolizado t_0 (Figura 3.32.A) y NaCAS/hidrolizado t_4 (Figura 3.32.B), las cuales fueron obtenidas por microscopía confocal según se indica en la Sección 2.2.9.2.

Las imágenes representan una guía visual sobre cómo la presencia de los hidrolizados afecta la microestructura de los geles de NaCAS. Se observa un entramado proteico donde los *píxeles* en negro representan los intersticios o poros y los *píxeles* en rojo el entramado proteico.

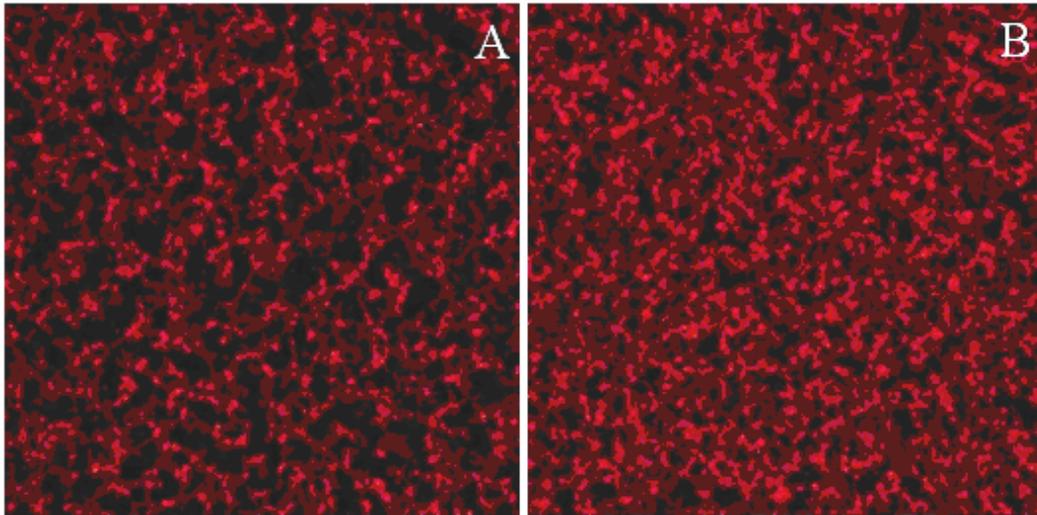


Figura 3.32. Imágenes de mezclas **A)** NaCAS bovino/hidrolizado t_0 y **B)** NaCAS bovino/hidrolizado t_4 obtenidas por microscopía confocal utilizando Rodamina B ($2 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$) como marcador fluorescente. $C_{\text{NaCAS}} 3 \text{ \% P/P}$, $C_{\text{hidrolizado}} 0,75 \text{ \% P/P}$, $R = 0,5$ y $T = 35 \text{ }^\circ\text{C}$.

La comparación de ambas imágenes muestra que el entramado proteico cambia en presencia de los hidrolizados. Los poros van disminuyendo su tamaño medio a medida que aumenta el tiempo de hidrólisis t_i (Tabla 3.15).

Tabla 3.15. Diámetro promedio de poro y área promedio de poro de geles ácidos obtenidos a partir de mezclas NaCAS bovino/hidrolizado t_i (3 % P/P/0,75 % P/P), donde t_i es el tiempo de hidrólisis. Relación de concentración GDL/NaCAS (R) de 0,5 y $T = 35 \text{ }^\circ\text{C}$

Mezclas NaCAS/hidrolizado t_i	Diámetro promedio de poro (μm) ^a	Área promedio de poro (μm^2) ^a	Grupos homogéneos ^b
t_0	$1,659 \pm 0,021$	$3,519 \pm 0,109$	BC
t_1	$1,733 \pm 0,035$	$4,027 \pm 0,211$	C
t_2	$1,678 \pm 0,025$	$3,750 \pm 0,138$	BC
t_3	$1,591 \pm 0,014$	$3,334 \pm 0,126$	AB
t_4	$1,521 \pm 0,014$	$2,862 \pm 0,083$	A

^a valor promedio \pm desviación estándar ($p < 0,05$)

^b diferentes letras indican valores significativamente diferentes de diámetro promedio y de área promedio de poro (A indica valores más bajos, B indica valores intermedios y C valores más altos, respectivamente).

Además, la distribución de los diámetros de poro indica que la mayor parte de los intersticios de menor tamaño fue mayor para los geles de NaCAS/hidrolizado t_4 (Figura 3.33).

Por lo tanto, a medida que t_i se incrementa, la cantidad de poros se incrementa y los mismos son de menor tamaño.

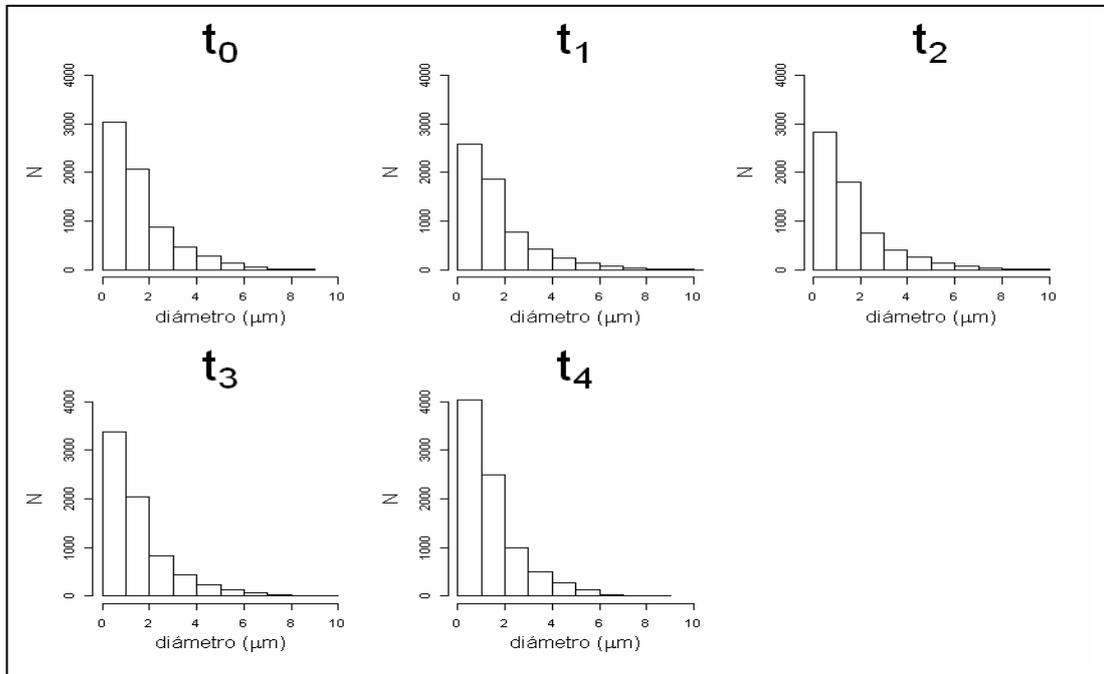


Figura 3.33. Distribución de diámetro de poro de geles ácidos de mezclas NaCAS bovino/hidrolizado t_i obtenidos por la adición de GDL ($R=0,5$) a 35°C , donde t_i indica el tiempo de hidrólisis. C_{NaCAS} 3 % P/P y $C_{\text{hidrolizado}}$ 0,75 % P/P.

Por otro lado, del análisis de los parámetros de textura, los cuales fueron obtenidos según la Sección 2.2.10, se puede observar que la presencia de los hidrolizados (t_{1-4}) incrementa los valores de los parámetros S y U (Tabla 3.16). Teniendo en cuenta los valores del parámetro U, las imágenes para t_0 son más suaves (más uniformes) que aquellas para t_4 , de esta manera la microestructura del gel NaCAS bovino/hidrolizado t_4 es más desordenado. Los valores del parámetro S nos llevan a la misma conclusión: las imágenes para t_0 poseen la menor variación de los niveles de grises. Por lo tanto, la presencia de los hidrolizados (t_{1-4}) en las mezclas NaCAS bovino/hidrolizado t_i contribuirían a que la estructura ordenada de los geles sea más débil, lo que concuerda con los valores G' obtenidos.

Tabla 3.16. Parámetros de textura obtenidos de las imágenes de microscopía confocal de los geles ácidos NaCAS bovino/hidrolizado t_i en función del tiempo de hidrólisis (t_i): Entropía de Shannon (S) y Uniformidad (U). C_{NaCAS} 3 % P/P, $C_{\text{hidrolizado}}$ 0,75 % P/P, $R = 0,5$ y $T = 35$ °C

t_i	S ^a	U ($\times 10^{-3}$) ^a	ANOVA para S ^b	ANOVA para U ^b
t_0	5,02 ± 0,03	39,43 ± 0,97	A	C
t_1	5,26 ± 0,02	32,95 ± 0,48	B	B
t_2	5,24 ± 0,03	32,81 ± 0,70	B	B
t_3	5,43 ± 0,04	27,96 ± 0,88	B	A
t_4	5,29 ± 0,02	30,20 ± 0,40	B	AB

^a valor promedio ± desviación estándar ($p < 0,05$)

^b diferentes letras indican valores significativamente diferentes de los parámetros S y U (A indica valores más bajos, B indica valores intermedios y C valores más altos, respectivamente).

3.3.1.7. Ensayos de actividades biológicas de los hidrolizados de NaCAS bovino obtenidos con PEP7

3.3.1.7.1. Ensayo de la capacidad antioxidante

La actividad antioxidante de los hidrolizados obtenidos a tiempos t_0 , $t_{0,5}$, t_1 , t_2 , t_3 , t_4 y t_6 se estudió utilizando el radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ según lo indicado en la Sección 2.2.17.1.1. Esta actividad tendió a aumentar con el aumento de tiempo de hidrólisis (Tabla 3.17). Aunque el NaCAS también exhibe actividad antioxidante, el incremento de esta actividad a medida que t_i crece sugiere que el proceso proteolítico contribuye a la actividad biológica.

Tabla 3.17. Actividad antioxidante de los hidrolizados de NaCAS bovino obtenidos a distintos tiempos de acción enzimática con PEP7.

Tiempo de hidrólisis (h)	Secuestro del radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (%) ^a
0	52,60 ± 0,11
0,5	59,5 ± 0,14
1	70,20 ± 0,03
2	67,90 ± 0,07
3	71,20 ± 0,03
4	74,10 ± 0,02
6	75,30 ± 0,02

^a valores promedios ± desviación estándar

Según la Sección 2.2.17.1.4 se determinó el poder reductor de los hidrolizados obtenidos a tiempos t_0 , $t_{0,5}$, t_1 , t_2 , t_3 , t_4 y t_6 (Tabla 3.18).

Tabla 3.18. Poder reductor de los hidrolizados de NaCAS bovino obtenidos a distintos tiempos de acción enzimática con PEP7.

Tiempo de hidrólisis (h)	Poder reductor (A a 700 nm)^a
0	0,106 ± 0,007
0,5	0,133 ± 0,002
1	0,171 ± 0,005
2	0,22 ± 0,03
3	0,30 ± 0,01
4	0,25 ± 0,01
6	0,262 ± 0,004

^a valores promedios ± desviación estándar

Los valores de poder reductor de los hidrolizados de NaCAS bovino presentaron un pico de actividad luego de las 3 h de hidrólisis, decreciendo a continuación. Esta variación podría estar vinculada a la masa molecular o tamaño de los péptidos [163]. Este comportamiento también fue reportado por otros autores [126, 165].

Según la Sección 2.2.17.1.3, se determinó la actividad quelante de Fe²⁺ de los hidrolizados obtenidos a tiempos t₀, t_{0,5}, t₁, t₂, t₃, t₄ y t₆ (Tabla 3.19).

Tabla 3.19. Actividad quelante de catión ferroso de los hidrolizados de NaCAS bovino obtenidos a distintos tiempos de acción enzimática con PEP7.

Tiempo de hidrólisis (h)	Actividad quelante de Fe²⁺ (%)^a
0	78,40 ± 0,01
0,5	89,80 ± 0,01
1	93,40 ± 0,02
2	93,30 ± 0,01
3	94,60 ± 0,04
4	80,30 ± 0,01
6	91,20 ± 0,01

^a valores promedios ± desviación estándar

Todos los hidrolizados de NaCAS bovino obtenidos con PEP7 exhibieron un aumento en la actividad quelante de hierro con respecto al control (t₀; 78,4%). Megías y col. (2008) reportaron que la histidina puede ser considerada como un agente quelante de metales ya que posee un anillo imidazol [166]. De acuerdo a los resultados, parecería que la hidrólisis

incrementa la accesibilidad del metal a los grupos histidina de las caseínas. Por lo tanto, la hidrólisis del NaCAS podría aumentar la biodisponibilidad del metal. Además, los hidrolizados de NaCAS obtenidos podrían ser utilizados como antioxidantes naturales para prevenir las reacciones de oxidación de los alimentos.

3.3.1.7.2. Actividad antimicrobiana

Se investigó la capacidad de los hidrolizados de NaCAS bovino, obtenidos a tiempos t_0 , $t_{0,5}$, t_1 , t_2 , t_3 , t_4 y t_6 , de inhibir el crecimiento de bacterias según la Sección 2.2.17.2. Los resultados se muestran en la Tabla 3.20.

Tabla 3.20. Actividad antibacteriana de hidrolizados de NaCAS bovino luego de 0,5 y 1 h de hidrolisis con PEP7.

Bacterias testeadas	Zona de inhibición (mm) ^a	
	0,5 h	1 h
Gram positivas		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15131	8,0	10,0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9634	- ^b	-
<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547	7,0	10,0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1901	-	-
Gram negativas		
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	8,0	11,0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	6,0	9,0

^a diámetro del halo

^b sin inhibición

Los hidrolizados obtenidos a tiempos 0,5 y 1 h con PEP7 demostraron actividad antibacteriana contra *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* y *Corynebacterium fimi*. Estos resultados son de importancia ya que las bacteria inhibidas son microorganismos relacionados a enfermedades transmitidas por los alimentos [158]. Por lo tanto, la actividad antimicrobiana observada para los hidrolizados de NaCAS puede representar una promisoriosa aplicación para prevenir la contaminación de alimentos por parte de estos microorganismos patógenos. El interés se incrementa si se tiene en cuenta que las caseínas son proteínas alimentarias seguras, abundantemente disponibles y de bajo costo.

Otros autores también reportaron la identificación de dominios antibacteriales dentro de la secuencia de distintas caseínas bovinas: la α_{s1} -CN [167-168], α_{s2} -CN [170-171], β -CN [168] y κ -CN [169].

Estos resultados sugieren que, si bien a bajas C_{NaCAS} , la presencia de hidrolizados bioactivos no produjo cambios significativos en el proceso de agregación ácida, a altas C_{NaCAS} , se modifican la microestructura y el comportamiento reológico de los geles ácidos. Esto último debe ser tenido en cuenta al momento de diseñar un alimento lácteo al cual se desee incorporar dichos hidrolizados.

3.4. Proteólisis de los WPI

3.4.1. Estudios de los hidrolizados proteicos de WPI obtenidos con PEP7

3.4.1.1. Obtención de los hidrolizados proteicos

Muestras de WPI fueron sometidas a hidrólisis enzimática en medio alcalino utilizando PEP7. La hidrólisis fue interrumpida a distintos tiempos por desnaturalización térmica de la enzima, tal como se explica en la Sección 2.2.14.

3.4.1.2. Estudio conformacional de los hidrolizados a través de espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de los cromóforos proteicos.

Se realizaron espectros de emisión de IF (Figura 3.34) de los hidrolizados obtenidos a partir de WPI por acción de PEP7.

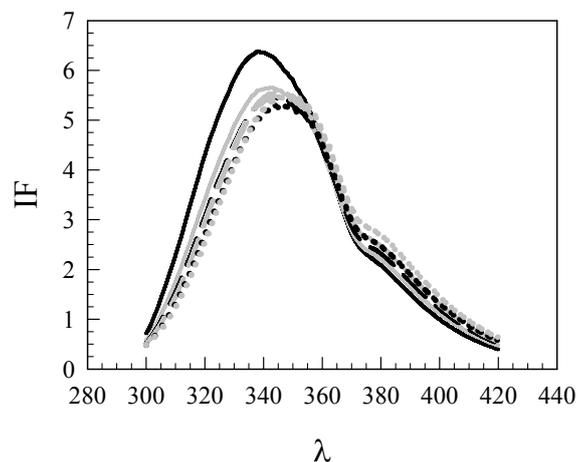


Figura 3.34. Intensidad de fluorescencia (IF) de hidrolizados de WPI obtenidos por hidrólisis con PEP7 a diferentes tiempos (t): t₀ (—); t₁ (—); t₂ (—); t₃ (—); t₄ (•••••) y t₇ (•••••). C_{hidrolizado} = 0,1 %P/P, rango λ_{em} = 300-420 nm, λ_{exc} = 298 nm y T = 35 °C.

Los espectros de emisión de fluorescencia revelaron la presencia de fluoróforos intrínsecos en la composición aminoacídica de los mismos. Se observó un corrimiento de 12 nm hacia la banda roja del espectro y una disminución de la intensidad de fluorescencia máxima respecto del WPI sin hidrolizar (t₀). Esto estaría indicando una mayor exposición de los fluoróforos proteicos al medio en el caso de los hidrolizados.

3.4.1.3. Evaluación del proceso de agregación ácida de los hidrolizados obtenidos con PEP7

Se evaluó la capacidad de agregación de los hidrolizados obtenidos frente a la adición de GDL (Figura 3.35).

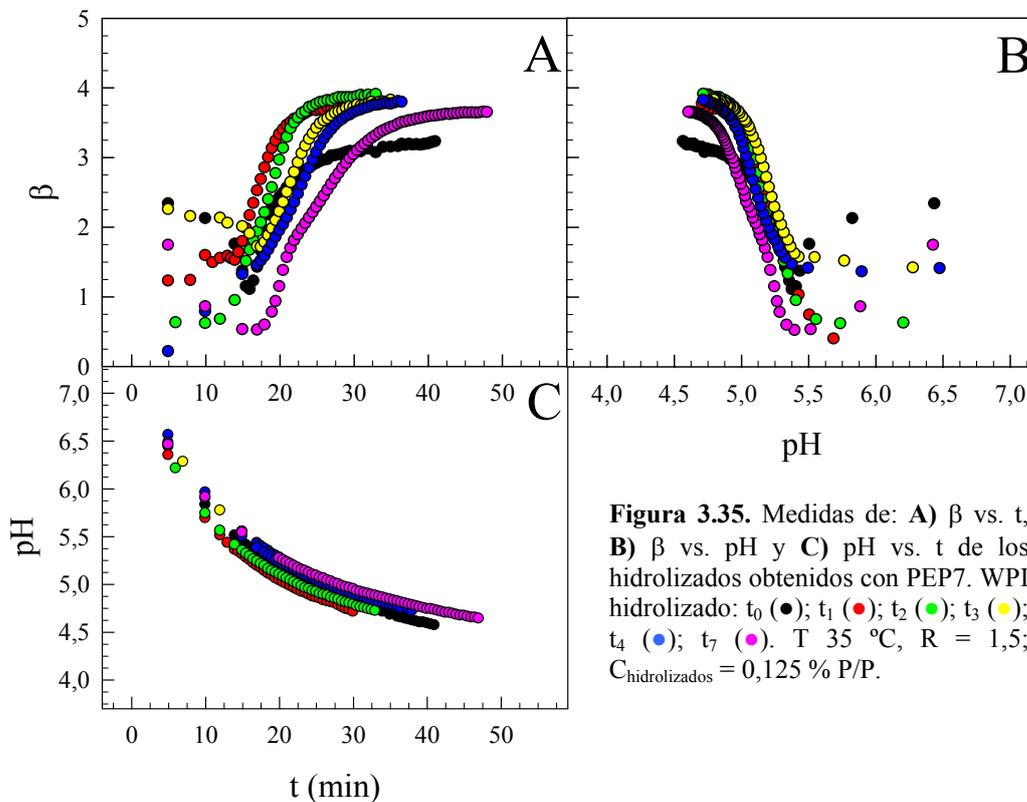


Figura 3.35. Medidas de: **A)** β vs. t , **B)** β vs. pH y **C)** pH vs. t de los hidrolizados obtenidos con PEP7. WPI hidrolizado: t_0 (●); t_1 (●); t_2 (●); t_3 (●); t_4 (●); t_7 (●). $T = 35\text{ }^\circ\text{C}$, $R = 1,5$; $C_{\text{hidrolizados}} = 0,125\text{ \% P/P}$.

Durante el proceso de agregación ácida de los hidrolizados de WPI no se modificó significativamente el valor de pH al cual comienza la agregación, es decir, no se afectó apreciablemente la estabilidad electrostática de los mismos.

La velocidad de descenso del pH aumentó ligeramente para los hidrolizados obtenidos durante la primera hora de hidrólisis, para luego disminuir a medida que crece el tiempo de hidrólisis (Figura 3.35.C). En concordancia con esto, el t_{ag} para hidrolizados t_1 es menor, sin embargo, se incrementa para los hidrolizados obtenidos a mayores t_i .

El grado de compactación de los agregados formados, estimado por D_f , es mayor que el obtenido para las muestras sin hidrolizar. Esto puede deberse a que al producirse la proteólisis pueden quedar expuestos mayor cantidad de grupos hidrofóbicos para participar en los reordenamientos que conducen a la compactación de los agregados. Por otra parte, Alting y col. han demostrado la importancia de la formación de enlaces disulfuro intermoleculares para las propiedades mecánicas de los geles ácidos de WPI [170]. Estos autores postularon que dichas

interacciones se forman a pH ácidos debido a un aumento de concentración efectiva proteica y, por lo tanto, de grupos tioles. Estos enlaces estarían involucrados en la estabilización y compactación de los agregados. La proteólisis podría aumentar la exposición de dichos grupos tioles.

3.4.1.4. Evaluación del proceso de agregación ácida de WPI en presencia de sus hidrolizados obtenidos PEP7

Con el objetivo de evaluar si la presencia de los hidrolizados afecta la cinética de agregación del WPI, se ensayó la agregación de mezclas WPI/hidrolizados t_i , por adición de GDL (Figura 3.36), previa desnaturalización de los WPI por calentamiento (80 °C, 30 min.) y rápido enfriamiento en baño de hielo y agua.

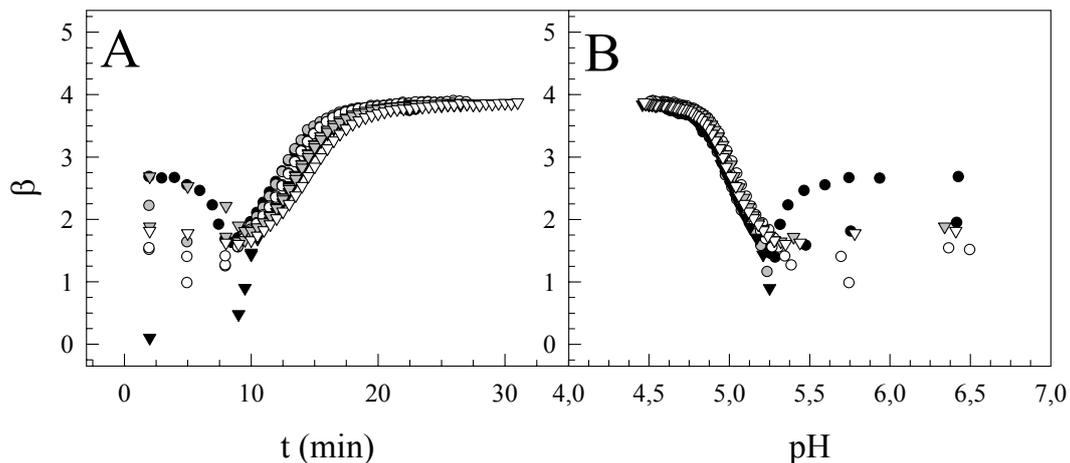


Figura 3.36. A) Variaciones del parámetro β en función del tiempo y B) β en función del pH, luego de la adición de GDL, a 35 °C, R = 1,5. C_{WPI} : 0,5% e hidrolizado t_i 0,125 % P/P ; t_0 (●); t_1 (○); t_2 (▼); t_3 (▽); t_4 (▼); t_7 (▽).

Durante el proceso de agregación ácida del WPI, la presencia de los hidrolizados no modificó sustancialmente el valor de pH al cual comienza la agregación, es decir no afectó apreciablemente la estabilidad electrostática del WPI. No se observaron modificaciones en la velocidad de descenso del pH (no se muestra). Tampoco se observó cambios en el tiempo al cual comienza la agregación como así tampoco en el grado de compactación de los agregados formados al final de la acidificación en presencia de los hidrolizados.

3.4.1.5. Ensayos de actividades biológicas de los hidrolizados de WPI obtenidos con PEP7

Según la Sección 2.2.17.1 se determinó la actividad antioxidante de los hidrolizados de WPI obtenidos con PEP7 a tiempos t_0 , t_1 , t_2 , t_3 y t_4 .

En la Tabla 3.21 se indica el porcentaje de actividad secuestradora de radical $ABTS^{\cdot+}$ (%) en función del tiempo de hidrólisis transcurrido. Se puede observar que el efecto de la hidrólisis incrementa aún más la capacidad de secuestro del radical $ABTS^{\cdot+}$ entre un 17,2-20%.

Tabla 3.21. Actividad antioxidante de los hidrolizados de WPI obtenidos a diferentes tiempos de acción enzimática con PEP7.

Tiempo de hidrólisis (h)	Secuestro del radical $ABTS^{\cdot+}$ (%) ^a
0	66,19 ± 1,75
1	86,18 ± 0,16
2	85,64 ± 3,02
3	84,40 ± 3,49
4	84,16 ± 3,81

^a valores promedios ± desviación estándar

Soares de Castro y Sato (2014) también informaron un aumento de la actividad antioxidante con el tiempo de hidrólisis de los WPI por acción de una proteasa ácida secretada por *Aspergillus oryzae* [171].

Se determinó la actividad quelante de Fe^{2+} de los hidrolizados obtenidos a tiempos t_0 , t_1 , t_2 , t_3 y t_4 (Tabla 3.22). Se puede observar que el efecto de la hidrólisis incrementa aún más el porcentaje de actividad quelante de catión ferroso entre un 24-29 %.

Tabla 3.22. Actividad quelante de catión ferroso de los hidrolizados de WPI obtenidos a distintos tiempos de acción enzimática con PEP7.

Tiempo de hidrólisis (h)	Actividad quelante de Fe^{2+} (%) ^a
0	46,31 ± 4,95
1	74,46 ± 3,19
2	75,44 ± 0,98
3	73,95 ± 5,52
4	70,30 ± 2,24

^a valores promedios ± desviación estándar

O' Loughlin y col. (2014) reportaron un incremento de la actividad quelante de Fe^{2+} de los WPI al ser hidrolizados con Corolase[®] [172].

Por otra parte, los hidrolizados de WPI obtenidos con PEP7 a distintos tiempos de acción enzimática (t_{1-4}) no evidenciaron poder reductor.

Teniendo en cuenta que los hidrolizados de WPI obtenidos conservan la capacidad de agregar en presencia de GDL y que su presencia no modifica apreciablemente la agregación del WPI, sería de importancia continuar los estudios de dichos procesos a concentraciones proteicas más cercanas a las utilizadas en la industria alimentaria.

3.4.2. Estudios de los hidrolizados proteicos de WPI obtenidos con PEP45

3.4.2.1. Obtención de los hidrolizados proteicos

Muestras de WPI fueron sometidas a hidrólisis enzimática en medio alcalino utilizando PEP45. La hidrólisis fue interrumpida a distintos tiempos por desnaturalización térmica de la enzima, tal como se explica en la Sección 2.2.13.

3.4.2.2. Estudio conformacional de los hidrolizados a través de espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de los cromóforos proteicos.

Se realizaron espectros de emisión de IF (Figura 3.37) de los hidrolizados obtenidos a partir de WPI por acción de PEP45.

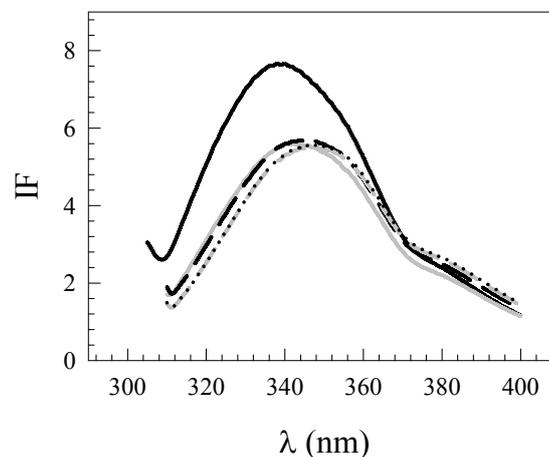


Figura 3.37. Intensidad de fluorescencia (IF) de hidrolizados de WPI obtenidos por hidrólisis con PEP45 a diferentes tiempos (t_i): t_0 (—); t_1 (—•—); t_2 (— —•—); t_3 (— — —•—); t_4 (•••••) y t_7 (•••••••). $C_{WPI} = 0,5 \%P/P$, $C_{hidrolizado} = 0,1 \%P/P$, rango $\lambda_{em} = 300-400$ nm, $\lambda_{exc} = 298$ nm y $T = 35$ °C.

Los espectros de emisión de IF revelaron la presencia de fluoróforos intrínsecos en la composición aminoacídica de los mismos. A medida que el tiempo de hidrólisis se incrementó, se observó un corrimiento de 8 nm hacia la banda roja del espectro y una disminución de la IF máxima respecto del WPI sin hidrolizar (t_0). En forma similar a lo informado para los hidrolizados de WPI obtenidos con PEP7, esto estaría indicando una mayor exposición de los fluoróforos proteicos al medio en el caso de los hidrolizados.

3.4.2.3. Evaluación del proceso de agregación ácida de WPI en presencia de sus hidrolizados obtenidos con PEP45

Con el objetivo de evaluar si la presencia de los hidrolizados afecta la cinética de agregación del WPI, se ensayó la agregación de mezclas WPI/hidrolizados t_i , por adición de GDL (Figura 3.38), previa desnaturalización de los WPI por calentamiento (80 °C, 30 min.) y rápido enfriamiento en baño de hielo y agua.

La presencia de los hidrolizados no alteró significativamente los tiempos de agregación ni el pH al cual ocurre la misma (5,4-5,5). Tampoco se modificó el grado de compactación de los agregados formados (medido a través de la D_f). Por lo tanto, es promisoriosa la inclusión de estos hidrolizados en sistemas de WPI sometidos a acidificación.

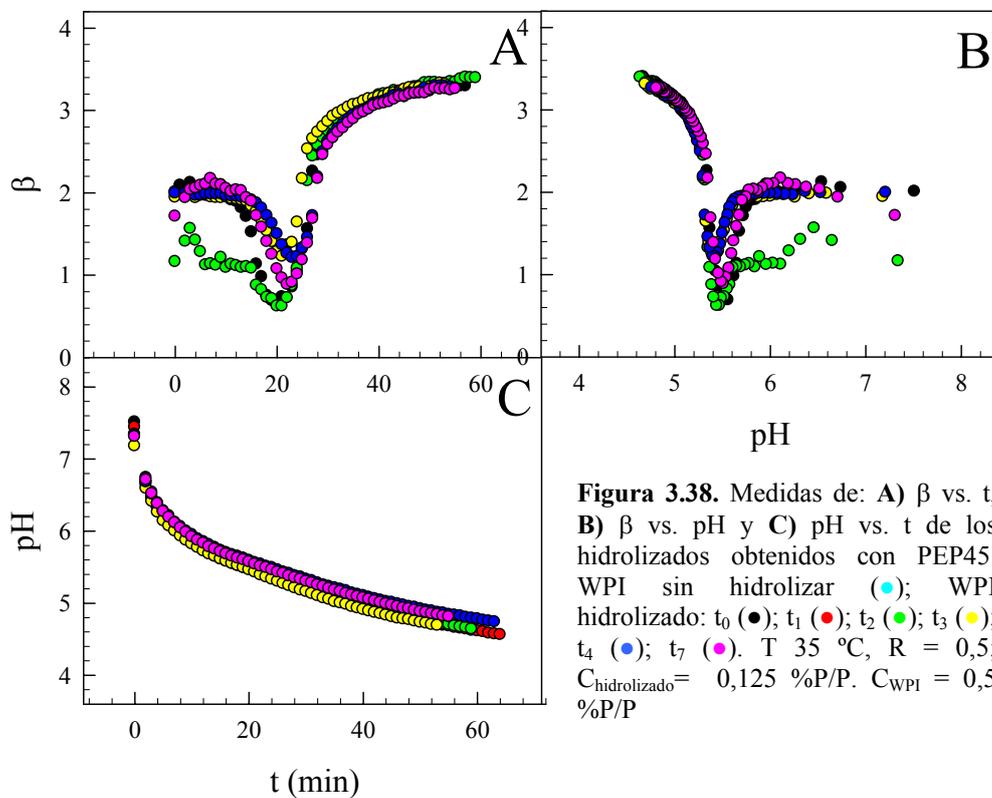


Figura 3.38. Medidas de: **A)** β vs. t , **B)** β vs. pH y **C)** pH vs. t de los hidrolizados obtenidos con PEP45. WPI sin hidrolizar (\circ); WPI hidrolizado: t_0 (\bullet); t_1 (\bullet); t_2 (\bullet); t_3 (\bullet); t_4 (\bullet); t_7 (\bullet). $T = 35\text{ }^\circ\text{C}$, $R = 0,5$; $C_{\text{hidrolizado}} = 0,125\text{ \%P/P}$. $C_{\text{WPI}} = 0,5\text{ \%P/P}$

3.4.2.4. Ensayos de actividades biológicas de los hidrolizados de WPI obtenidos con PEP45

3.4.2.4.1. Ensayo de capacidad antioxidante

Según la Sección 2.2.17.1 se determinó la actividad antioxidante de los hidrolizados obtenidos a tiempos t_0 , t_1 , t_2 , t_3 , t_4 y t_7 (Tabla 3.24). Al igual que en el caso de la hidrólisis con PEP7 (Tabla 3.21), se observó un aumento de la actividad secuestradora del radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ para tiempos crecientes de hidrólisis.

Tabla 3.24. Actividad secuestradora de radical ABTS^{·+} (%) de los hidrolizados de WPI obtenidos a distintos tiempos de acción de PEP45.

Tiempo de hidrólisis (h)	Secuestro del radical ABTS ^{·+} (%) ^a
0	61,68 ± 1,91
1	67,68 ± 1,93
2	71,84 ± 1,68
3	74,87 ± 2,40
4	79,45 ± 2,32
7	81,60 ± 2,73

^a valores promedios ± desviación estándar

No obstante, para los hidrolizados de WPI con PEP45 ($C_{\text{hidrolizado}} = 30 \text{ g.L}^{-1}$) este incremento fue menor y recién a las 7 h de hidrólisis se obtuvo una actividad antioxidante similar a la obtenida con la PEP7 ($C_{\text{hidrolizado}} = 15 \text{ g.L}^{-1}$) a pesar de tratarse de un sistema más concentrado.

Por otra parte, los hidrolizados de WPI obtenidos con PEP45 a distintos tiempos de acción enzimática (t_{1-7}), no evidenciaron actividad antioxidante determinada por el método de DPPH (Sección 2.2.14.1.4).

Los ensayos de la actividad quelante del Fe^{2+} de los hidrolizados de WPI obtenidos a tiempos t_0 , t_1 , t_3 , t_4 y t_7 de acción enzimática, se muestran en la Tabla 3.25. No se observaron cambios significativos en la actividad quelante del ion Fe^{2+} respecto de la inicial (t_0).

Tabla 3.25. Capacidad quelante de Fe^{2+} (%) para los distintos hidrolizados de WPI obtenidos a distintos tiempos de acción enzimática de PEP45.

Tiempo de hidrólisis (h)	Actividad quelante de Fe^{2+} (%) ^a
0	94,34 ± 2,39
1	93,35 ± 1,78
3	96,27 ± 0,94
4	94,03 ± 0,74
7	89,57 ± 2,02

^a valores promedio ± desviación estándar

Al igual que en el caso de los hidrolizados de WPI obtenidos con PEP7, los obtenidos a distintos tiempos de acción enzimática (t_{1-7}) de la PEP45, no evidenciaron poder reductor según el método descrito en la Sección 2.2.14.1.4.

3.4.2.2. Actividad antimicrobiana

Según la Sección 2.2.17.2 y 2.2.17.3 se determinó la actividad antimicrobiana de los hidrolizados obtenidos a tiempos t_0 , t_1 , t_3 , t_4 y t_7 . No se observó actividad antimicrobiana para las cepas ensayadas.

Sin embargo, las actividades antioxidantes que presentaron estos hidrolizados y el hecho de que su presencia no modificó significativamente la agregación ácida del WPI, los convierte en aditivos promisorios para la industria láctea.

3.5. Ensayos de coagulación enzimática de MC bovinas por acción de PEP7 y PEP45

3.5.1. Capacidad coagulante

Para estudiar el efecto de diversos factores sobre la coagulación de las MC se pueden considerar varios de estos factores al mismo tiempo, tal como fuera reportado por otros autores para proteasas microbianas que promueven la coagulación de la leche [173-174].

La capacidad de PEP7 y PEP45 para coagular las MC se determinó según lo explicado en la Sección 2.2.14. Para evaluar el efecto del pH y la T sobre la actividad coagulante de las MC con ambos *pooles* enzimáticos, se realizó un diseño factorial 3^2 como un ensayo preliminar, tal como se indica en la Tabla 3.26.

Tabla 3.26. Diseño factorial para PEP7 y PEP45. Factores: pH y T, variable respuesta: ACM ($U_{ACM} \cdot mL^{-1}$)

pH ^a	T (°C) ^a	ACM de P7 ($U_{ACM} \cdot mL^{-1}$)	ACM de P45 ($U_{ACM} \cdot mL^{-1}$)
6,4 (-1)	34 (-1)	266,7	400,0
7,4 (0)	34 (-1)	266,7	400,0
8,4 (+1)	34 (-1)	144,9	266,7
6,4 (-1)	44 (0)	266,7	363,6
7,4 (0)	44 (0)	266,7	421,1
8,4 (+1)	44 (0)	114,3	140,4
6,4 (-1)	54 (+1)	381,0	666,7
7,4 (0)	54 (+1)	500,0	727,3
8,4 (+1)	54 (+1)	228,6	258,1

^a unidades codificadas entre paréntesis

Para PEP7 y PEP45, no se observó interacción entre los factores pH y T ($p < 0,05$). [175-176]. En la Tabla 3.27 se muestra los valores de p correspondientes a los análisis de la varianza

para PEP7 y PEP45. Para PEP7 y PEP45 se determinó que los factores pH y T afectan significativamente la coagulación de las MC.

Tabla 3.27. Valores p de diseño factorial 3² para PEP7 y PEP45

<i>Pool</i> Enzimático	Fuente	p
PEP7	pH	0,038
	T	0,039
PEP45	pH	0,031
	T	0,062

En las Ecuaciones 3.2 y 3.3 se muestran los modelos de regresión lineal correspondientes para PEP7 y PEP45, respectivamente.

$$ACM(PEP7) = 488 - 71,1 \cdot pH + 6,96 \cdot T \quad 3.2$$

$$ACM(PEP45) = 927 - 128 \cdot pH + 9,50 \cdot T \quad 3.3$$

Dentro de los rangos de T (34°C-54°C) y pH (6,4-8,4) ensayados, para PEP7, si se mantiene constante el pH, por cada aumento unitario de T, se espera que la ACM se incremente en ~7 U_{ACM} y si se mantiene constante la T, por cada aumento unitario del pH se espera que la ACM descienda en 71,1 U_{ACM}.

De forma similar, para PEP45 se puede concluir que, si se mantiene constante el pH, por cada aumento unitario de T, se espera que la ACM se incremente en 9,5 U_{ACM} y si se mantiene constante la T, por cada aumento unitario del pH se espera que la ACM descienda en 128 U_{ACM}. Como para PEP7, la T y el pH ejercen efectos opuestos sobre la ACM.

Al crecer la T, aumenta la velocidad de los procesos que conducen a la coagulación y además se intensifican las interacciones de tipo hidrofóbico ($\Delta H > 0$) que participan en dicho proceso y, por lo tanto, se aumenta la ACM. Al aumentar el pH, se incrementa la densidad de carga superficial negativa de las MC y con ello aumenta su estabilidad electrostática, con el consiguiente retardo para coagular. Por lo tanto, se disminuye la ACM.

3.5.2. Evaluación de la microestructura de los coágulos obtenidos

En la Figura 3.39 se muestran imágenes representativas de coágulos de MC obtenidos post acción enzimática de PEP7, las cuales fueron obtenidas por microscopía óptica según se indica en la Sección 2.2.9.2.

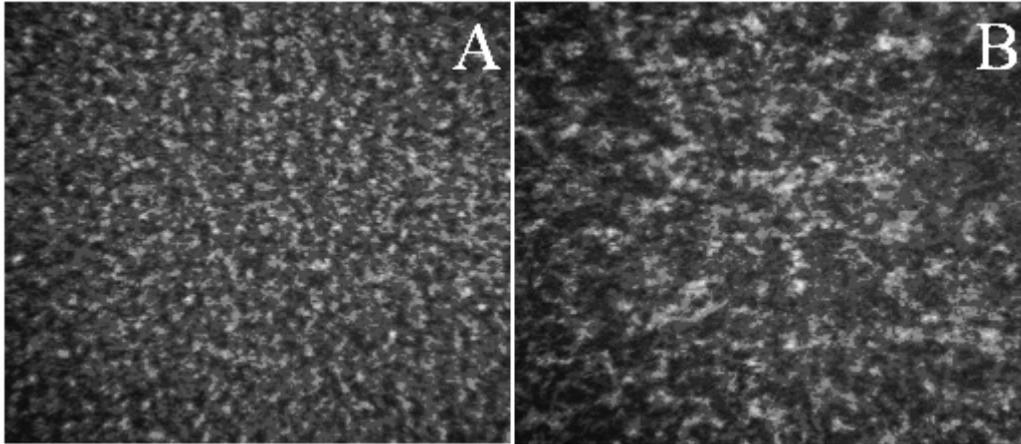


Figura 3.39. Imágenes de geles de MC por acción enzimática de **A)** PEP7, pH=6,4 y T=34°C y de **B)** PEP45, pH=6,4 y T=34°C, obtenidas por microscopía óptica. Concentración CN 10%. Objetivo 100x, zoom 4x y adaptador de cámara para microscopio de 54 mm.

Las imágenes representan una guía visual de la microestructura de los coágulos de MC obtenidos por acción de PEP7 o PEP45 a pH 6,5 y T 34°C. Se observa un entramado proteico (*píxeles* en blanco) y se pueden identificar los intersticios o poros (*píxeles* en negro). La comparación de ambas imágenes muestra que ambos *pools* enzimáticos, a igualdad de condiciones, no generan coágulos con el mismo entramado proteico (grado de compactación).

A partir de la imágenes obtenidas para todas las condiciones evaluadas (Tabla 3.26), se evaluó la microestructura de los coágulos obtenidos a través de la determinación de la distribución de los diámetros de poros, la cual se muestra en las Figuras 3.40 y 3.41.

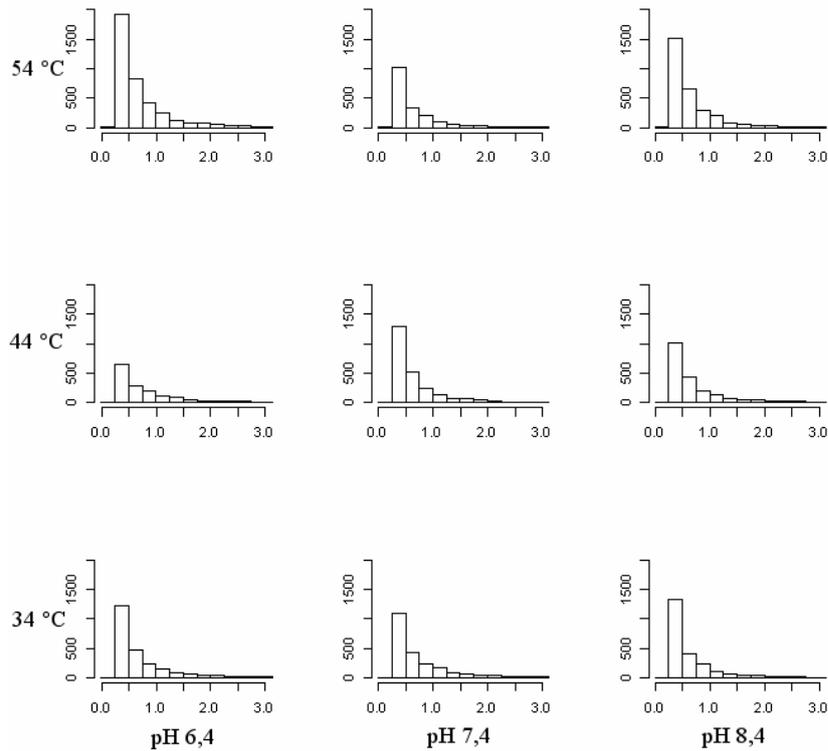


Figura 3.40. Distribución de diámetro de poro de geles de MC obtenidos por la acción de PEP7. Diámetro de poro (μm) vs. frecuencia absoluta.

En general, se observaron cambios en la distribución de tamaño de poro para valores altos de T y bajos de pH, presentándose un mayor número de poros de menor tamaño. De acuerdo a los efectos opuestos observados de la T y el pH sobre la actividad coagulante de los *pooles* enzimáticos, se esperaba observar diferencias marcadas en la distribución para pH 8,4 y T 34 °C (alto pH y baja T, baja ACM de PEP7) en comparación a pH 6,4 y T = 54 °C (bajo pH y alta T, alta ACM de PEP7). Esto se confirmó, como se puede observar en la Figura 3.40, con un incremento del ~80% en el número de poros de menor tamaño al ir de baja ACM a alta ACM.

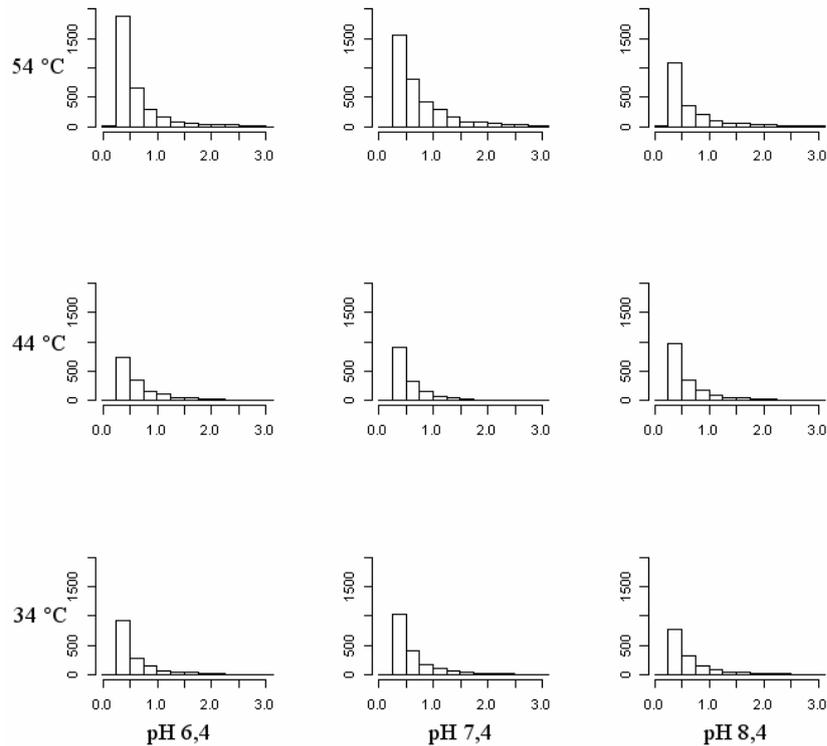


Figura 3.41. Distribución de diámetro de poro de geles de MC obtenidos por la acción de PEP45. Diámetro de poro (μm) vs. frecuencia absoluta.

En el caso de PEP45, similarmente a lo observado para PEP7, se obtuvieron mayor número de poros de menor tamaño para altas T y bajos valores de pH. La dependencia de la ACM con respecto a la T y pH (Ecuación 3.3) evidenció una mayor diferencia en la distribución para pH 8,4 y T 34 °C (alto pH y baja T, baja ACM de PEP45) en comparación con un pH de 6,4 y T de 54 °C (bajo pH y baja T, alta ACM PEP45), que se muestra en la Figura 3.41. En la misma se puede observar un incremento de $\sim 110\%$ en el número de poros de menor tamaño al ir de baja a alta ACM.

El análisis de la distribución de poros para las condiciones de pH y T mencionadas anteriormente, tanto para PEP7 y PEP45, mostró diferencias en la microestructura para los coágulos obtenidos y esto estaría relacionado con la baja o alta ACM de las mismas. Una baja ACM promovió la formación de un entramado proteico con poros relativamente grandes, mientras que una elevada ACM podría ser un indicador de que el *pool* enzimático se encuentra cerca de las condiciones de pH y T óptimas. Esto último condujo a la formación de coágulos con poros de menor tamaño medio, es decir, con entramado proteico más compacto.

Con el propósito de caracterizar en mayor detalle la microestructura de los coágulos se realizó un análisis textural a través del cálculo de los parámetros de textura S y U de las imágenes obtenidas por microscopía óptica, según la Sección 2.2.10. A partir de este análisis se pudieron obtener ecuaciones modelo descriptivas y predictivas de la textura de los coágulos en diversas condiciones de pH y T.

Los valores del factor pH evaluados fueron 6,4; 7,4 y 8,4 y para el factor T fueron 34 °C, 44 °C y 54 °C. Se realizó un diseño de experimento 3^2 (n=3) para los parámetros S y U, obteniéndose los valores de p que se muestran en la Tabla 3.28.

Tabla 3.28. Valores p de análisis de la varianza para S y U de las imágenes de los coágulos obtenidos por PEP7

Parámetros de textura	Fuente	PEP7	PEP45
		p	p
S	pH	0,001	0,044
	T	0,012	0,001
	pH*T	0,080	0,001
U	pH	0,004	0,033
	T	0,001	0,005
	pH*T	0,087	0,001

Para PEP7, la ecuación modelo en unidades codificadas de la variación del parámetro S, sin interacción ($p>0,05$), fue:

$$S = 6,24 - 0,133 \cdot T + 0,0065 \cdot \text{pH} \quad 3.4$$

El modelo sin interacción ($p>0,05$) obtenido para U fue:

$$U = 16,6 \cdot 10^{-3} + 2,17 \cdot 10^{-3} \cdot T - 0,455 \cdot 10^{-3} \cdot \text{pH} \quad 3.5$$

Una alta T y un bajo pH aumenta la U y disminuye la S (Ecuaciones 3.4 y 3.5). Valores elevados de U (aumento de la uniformidad) y bajos de S (disminución de la entropía) se corresponden con partículas localizadas en sectores bien definidos. Por otro lado, una baja T y un alto pH conllevarían a bajos valores de U (disminuye la uniformidad) y elevados valores de S (aumenta la entropía), lo que se corresponde con ordenamientos irregulares.

Por otra parte, el efecto de la T, que afecta a S ~20 veces más y a U ~ 5 veces que el pH, indicaría que en el proceso de formación del coágulo participan principalmente interacciones de tipo hidrofóbico, ya que un aumento de T conduce a coágulos más estructurados.

Considerando la distribución de los diámetros de poros en forma conjunta a los parámetros de textura, en el rango estudiado (34°C-54°C y 6,4-8,4 pH) PEP7 posee probablemente una óptima ACM a valores altos de T y bajos de pH generando geles mayormente estructurados y con tamaño de poros pequeños.

Para PEP45, el modelo de regresión en unidades codificadas para S fue:

$$S = 6,27592 + 0,133107 \cdot T - 0,0234917 \cdot \text{pH} - 0,0715088 \cdot T \cdot \text{pH} \quad 3.6$$

El modelo obtenido para U fue:

$$U = 15,9515 \cdot 10^{-3} - 1,47656 \cdot 10^{-3} \cdot T + 0,229222 \cdot 10^{-3} \cdot \text{pH} + 0,71725 \cdot 10^{-3} \cdot T \cdot \text{pH} \quad 3.7$$

A diferencia de PEP7, hay efecto significativo de la interacción de los factores pH y T (Tabla 3.28). Dado que los parámetros S y U reflejan la microestructura de los coágulos formados, esto podría indicar una acción coagulante de la PEP45 distinta a la de PEP7. Probablemente escindan diferentes uniones peptídicas y esto conduzca a diferentes tipos de interacciones durante la formación y estructuración de los coágulos. Como se mencionó para PEP7, si el pH y la T afectan el mecanismo de acción de PEP45, y este último influye sobre la microestructura de los coágulos obtenidos, el efecto logrado depende de los valores particulares que tomen el pH y la T. Por otra parte, el hecho que exista una interacción entre los factores T y pH, podría estar indicando una participación de interacciones electroestáticas en la formación de dichos coágulos.

Estos resultados preliminares para PEP7 y PEP45 avalan la aplicación de Diseños de Experimentos para evaluar la significancia de la T, pH y la concentración total de *pool* enzimático sobre el tiempo de coagulación (t_c), la velocidad inicial de agregación (v_i) y la dimensión fractal (D_f) del proceso de coagulación que promueven. En el trabajo de tesis de grado realizado por la estudiante de la carrera de Lic. en Biotecnología Ana Apesteuguía, bajo mi dirección asistente, se realizaron los Diseños de Experimentos mencionados [177-178].

3.5.3. Análisis multirespuesta de los resultados de Diseños de Experimentos

En la industria de los alimentos es deseable obtener geles lácteos con alta consistencia, por lo tanto el presente trabajo se orientó a la obtención de dicha cualidad. Para lograr esto último, el proceso de coagulación debe proceder lentamente para conducir a coágulos bien estructurados (D_f elevada) [179]. Adicionalmente, para manufacturar un producto menos costoso es conveniente utilizar pequeñas cantidades de enzima coagulante.

En los modelos obtenidos de los Diseños de Experimentos para PEP7, se encontró que valores mínimos de E estaban asociados con valores máximos de t_c [177]. Por lo tanto, se abordó la consideración conjunta de maximizar las variables D_f y t_c de los modelos correspondientes, y con estos requisitos se obtuvieron las siguientes condiciones óptimas: $\text{pH} = 7,4$ y $T = 44$ °C [180].

Este enfoque, busca según un criterio establecido, encontrar las mejores condiciones operativas en la región estudiada y a partir de ellas diseñar una nueva región de análisis para futura experimentación.

3.5.4. Actividad biológica de los sueros obtenidos

Se han reportado péptidos con diversas bioactividades en productos lácteos tales como diferentes variedades de quesos y leches fermentadas [181-183]. Por esta razón, los sueros (SPP7 o SPP45), obtenidos post coagulación enzimática por acción de PEP7 o PEP45 a $70 \text{ U}_{\text{AE}} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($1.600 \text{ U}_{\text{AE}} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína), $\text{pH} 7,4$ y 44 °C (condiciones óptimas), fueron liofilizados para el posterior estudio de su capacidad antioxidante: captación del radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$, poder reductor y actividad quelante del catión ferroso (Sección 2.2.17.1).

Los resultados mostraron que SPP7 y SPP45 mostraron un porcentaje de inhibición de la actividad antioxidante por el método de captura del radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ de $(19,77 \pm 1,49) \%$ y de $(31,89 \pm 1,79) \%$, respectivamente. Se realizó una curva de calibración con ácido ascórbico y se determinó que dichas capacidades antioxidantes fueron equivalentes a concentraciones de $0,56 \text{ mM}$ y 1 mM de ácido ascórbico, respectivamente. Otros autores han identificado un péptido derivado de la $\kappa\text{-CN}$ con actividad secuestradora del radical DPPH^{\cdot} en la leche fermentada con *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaris* [184], Además, Hernández-Ledesma et al. (2005) encontraron una moderada capacidad secuestradora de radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ en una leche fermentada comercial [185].

En el estudio del poder reductor se observó un incremento lineal del mismo (desde $0,15$ a $0,5$ unidades de A a 700 nm) al incrementar la concentración de SPP7 y SPP45 en valores comprendidos entre 5 y $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Figura 3.39). Ha sido reportado que el poder reductor de los

componentes bioactivos está asociado con su actividad antioxidante [186-187]. Los resultados indican que el poder reductor contribuiría significativamente a los efectos antioxidantes observados. Los péptidos actuarían como agentes reductores a través de la donación de electrones para la formación de productos más estables.

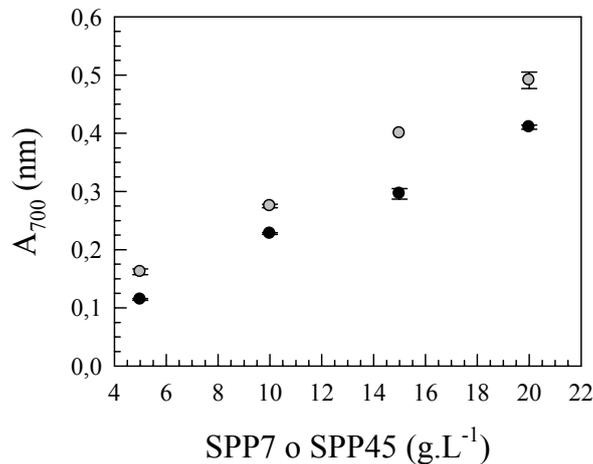


Figura 3.39. Poder reductor de SPP7 y SPP45 determinado como valor de Abs a 700 nm. SPP7 (●) y SPP45 (○).

Por último, no se observó actividad quelante del Fe^{2+} de SPP7 y SPP45. Estudios previos han demostrado que ciertos péptidos derivados de alimentos como caseinofosfopéptidos presentaron mayor efecto de inhibición de la oxidación lipídica por acción de la hidrólisis a pesar de poseer de leve a moderada actividad quelante de hierro [188]. Por lo tanto, las propiedades antioxidantes no pueden atribuirse únicamente a la quelación de metales sino también al secuestro de radicales libres, como sería el caso para SPP7 o SPP45.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES

CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES

4.1. Estado inicial de las CN bovinas y ovinas previo a la hidrólisis

El sistema estudiado, proteína-catión, en el rango de concentraciones de CAS de 0,125 a 15 g.L⁻¹ y de Ca²⁺ entre 1 a 40 mM y los resultados obtenidos a pH y T constantes utilizando métodos químicos, electroforéticos, viscosimétricos y matemáticos nos permiten concluir que los agregados de CAS se encuentran en múltiples equilibrios de agregación o autoagregación.

Un equilibrio correspondería a la proteína agregada – proteína disgregada. Las proteínas disgregadas presentarían mayor predisposición a la incorporación del Ca²⁺ debido al fácil acceso de este catión a los sitios de unión correspondientes. Esta unión del Ca²⁺ a la proteína disgregada desplazaría el equilibrio de agregación provocando una disminución del número de agregados y, en consecuencia, una disminución del tamaño medio de las partículas en suspensión. El Ca²⁺ se uniría probablemente en primer lugar a las α_s -CN produciendo un enriquecimiento de los precipitados en esta fracción proteica coincidente con la más alta sensibilidad de la α_s -CN al catión respecto a las otras CN. En forma paralela, el Ca²⁺ provocaría un mayor grado de compactación en las CN.

A medida que la concentración de Ca²⁺ aumenta, se comienzan a formar los agregados de caseinato de calcio (ACC). Estos agregados, de menor tamaño en comparación a los agregados iniciales de NaCAS, superan a éstos en número. Cuando la cantidad de estos agregados supera un valor crítico, comienza a producirse un aumento de tamaño generado por la agregación de los ACC.

Los valores de las constantes de unión al Ca²⁺, determinadas aplicando el modelo termodinámico de funciones vinculadas de Wyman, estarían relacionados con el modelo propuesto. Los valores de n y n' obtenidos se podrían relacionar con poblaciones de sitios de unión presentes en las CN, pero teniendo en cuenta que los mismos son un promedio de distintos sitios de unión presentados al acceso del Ca²⁺ por las CN como un conjunto y teniendo en cuenta las interacciones existentes entre ellas. Las poblaciones de sitios de unión al Ca²⁺ en la primera etapa de *salting-out* estarían relacionadas probablemente con los residuos fosfoserinas de las CN que tienen *in vitro* los valores de afinidad más altos y las poblaciones de sitios de unión al Ca²⁺ en la segunda etapa de *salting-out* estarían relacionadas probablemente con los grupos carboxílicos de las mismas.

Comparativamente, se encontró que los ACC ovinos fueron menos estables que los ACC bovinos. La diferencia observada podría deberse a la composición proteica de los agregados debido a que los CAS ovinos poseen elevadas proporciones de α - y β -CN, una baja proporción

de κ -CN y una mayor cantidad de grupos fosfoserinas que actúan como sitios de unión al Ca^{2+} . Los ACC bovinos no evidenciaron cambios significativos en la hidrofobicidad superficial a comparación con los ACC ovinos que, a concentraciones crecientes de Ca^{2+} , se compactaron decreciendo la exposición de sus sitios hidrofóbicos.

Estos estudios permitieron evaluar el estado inicial de las CN bovinas y ovinas previo a la hidrólisis enzimática, adquiriendo una mejor comprensión de su comportamiento frente al ión calcio.

4.2. Caracterización de los péptidos obtenidos por hidrólisis de NaCAS o WPI y efecto sobre las propiedades estructurales

Los hidrolizados de NaCAS ovino obtenidos por acción enzimática de PEP7 o PEP45, mostraron algunas diferencias. Los hidrolizados obtenidos por acción de PEP7 presentaron masas moleculares menores a 2 kDa. Al cabo de 4 h de hidrólisis PEP7 no podría hidrolizar ulteriormente los enlaces que quedan dentro de los péptidos generados, un hecho que está directamente influenciado por la especificidad enzimática.

PEP45 presentó un efecto de hidrólisis distinto, el mismo actuó efectivamente hasta las 2 h de hidrólisis, decreciendo de ahí en adelante su velocidad de acción sobre las CN, indicando probablemente una disminución de la accesibilidad de los enlaces peptídicos para ser escindidos dentro del sustrato. La hidrólisis provocaría un cambio de polaridad del entorno de los fluoróforos intrínsecos hacia medios más polares, lo que estaría vinculado al aumento de exposición de dichos grupos al medio. Además, provocaría una mayor exposición de grupos hidrofóbicos en la superficie de los hidrolizados obtenidos. En este sentido, las proteasas tipo subtilisina, que usualmente muestran preferencia por los residuos aromáticos y/o hidrofóbicos del sitio P1 del enlace peptídico escindible (P1'-P1) en el sustrato, están entre las enzimas proteolíticas producidas por el *Bacillus* sp. P45.

En el caso del NaCAS bovino, por acción enzimática de PEP7, se obtuvieron péptidos de masa molecular menor a 3 kDa, y dicho *pool* enzimático evidenció una mayor velocidad de hidrólisis durante las primeras cuatro horas, luego de lo cual disminuyó su acción. Este descenso de la velocidad de hidrólisis indica una menor disponibilidad de enlaces peptídicos escindibles. La pérdida de grupos amino, es decir, de enlaces peptídicos escindidos, fue menor para el NaCAS ovino al ser hidrolizado por el PEP7, lo cual podría reflejar la heterogeneidad del sustrato (CN) entre ambas especies. El efecto de la hidrólisis condujo a un cambio conformacional y, como consecuencia, un incremento de la polaridad en los alrededores de los fluoróforos intrínsecos proteicos en los péptidos.

Los hidrolizados de WPI, obtenidos por acción enzimática de PEP7 o PEP45, incrementaron la exposición de sus fluoróforos intrínsecos al medio.

La caracterización de las distintas preparaciones enzimáticas (PEP7, PEP45) actuando en distintas proteína de origen (NaCAS ovino y bovino, WPI) puede contribuir al modelado de la cantidad y tamaño de péptidos para dietas especiales. Adicionalmente, los diversos hidrolizados obtenidos podrían ser útiles para su aplicación en la industria alimentaria, con el propósito de incrementar el valor nutricional.

4.3. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre la capacidad de agregación y/o gelación proteica frente a la acidificación

La distinta naturaleza en composición, carga, tamaño y proteínas de origen de los péptidos obtenidos por las preparaciones enzimáticas se vieron reflejadas en sus distintos comportamientos para agregar ante la presencia de GDL, observándose, en algunos casos, pérdida de la capacidad de agregación, diferencias en la estabilidad electrostática o en el tiempo para iniciar la coagulación y en el grado de compactación alcanzado.

Los perfiles de agregación ácida proteica evidenciaron dos etapas bien definidas. La primera etapa estaría relacionada con la existencia de un proceso de disociación y/o un cambio conformacional de los agregados coloidales preexistentes como micelas, submicelas o pequeños agregados bien definidos con forma similar a una estrella. Por lo tanto, en esta primera etapa, el descenso del diámetro medio puede deberse a la disociación de los agregados preexistentes en simultáneo con la formación de una gran cantidad de nuevos agregados de menor tamaño debido a la reducción gradual de la carga neta de las partículas, lo que reduce su estabilidad electrostática y las hace más susceptibles a la floculación. La segunda etapa, a valores de pH cercanos al punto isoeléctrico, cuando las partículas han perdido su estabilidad electrostática, revela la rápida formación de agregados de gran tamaño hasta la formación de una red o malla.

Los hidrolizados de NaCAS ovino obtenidos con PEP7 no agregaron frente a un descenso del pH. Por el contrario, los hidrolizados obtenidos con PEP45 conservaron la capacidad de agregar. En los mencionados perfiles, los hidrolizados obtenidos a mayores tiempos, iniciaron antes la segunda etapa de agregación, probablemente debido al incremento de la hidrofobicidad superficial observado para los mismos lo que favorece las interacciones hidrofóbicas atractivas que conducen a la agregación entre partículas. Adicionalmente, el grado de compactación alcanzado por los agregados fue similar al alcanzado por la proteína sin hidrolizar.

En forma semejante a lo observado para los hidrolizados de NaCAS ovino con PEP7, tampoco se verificó agregación de los hidrolizados de NaCAS bovino.

Los hidrolizados de WPI obtenidos con PEP7 evidenciaron la capacidad de agregar. Durante dicho proceso no se modificó significativamente el valor de pH al cual comienza la agregación, lo que implicaría que no se afectó apreciablemente la estabilidad electrostática de los mismos. Los hidrolizados mostraron diferencias entre ellos con respecto a los tiempos de inicio de la agregación debido a cambios en la velocidad de descenso del pH. A su vez, presentaron mayor grado de compactación en relación a la muestra sin hidrolizar, lo que podría deberse a que al producirse la proteólisis quedan expuestos mayor cantidad de grupos hidrofóbicos para participar en los reordenamientos que conducen a la compactación de los agregados. Adicionalmente, la proteólisis podría aumentar la exposición de grupos tioles, involucrados probablemente en la formación de enlaces disulfuro intermoleculares que aportarían a la estabilización y compactación de los agregados.

La presencia de los hidrolizados de NaCAS o WPI obtenidos con PEP7 o PEP45 no modificó apreciablemente la cinética de agregación de mezclas de los mismos con sus respectivas proteínas de origen ni su estabilidad electrostática. Tampoco se observaron modificaciones en la velocidad de descenso del pH. Adicionalmente, no se detectaron cambios significativos del grado de compactación de los agregados formados al final de la acidificación. Estos resultados sugieren la posibilidad de inclusión de los hidrolizados en una matriz de la proteína de origen sin alterar significativamente los perfiles de la agregación. Aunque el grado de compactación alcanzado puede relacionarse a las propiedades reológicas, se necesitaría realizar estudios adicionales para evaluar el efecto de la incorporación de los hidrolizados sobre la estructura y textura de los geles ácidos.

Para las mezclas del NaCAS bovino y sus hidrolizados obtenidos con PEP7 se realizó el estudio a concentraciones tales que se obtuvieran geles ácidos al final del proceso por adición de GDL, los cuales fueron caracterizados mediante la evaluación de sus propiedades reológicas y de su microestructura.

Los resultados evidenciaron que no ocurrieron mayores cambios en la cinética del proceso, pero sí en la elasticidad final alcanzada por los geles. Luego de iniciada la formación del gel, se produce un aumento de contacto entre las partículas de NaCAS con la consiguiente fusión de partículas y el subsecuente reordenamiento interparticular debido a la reversibilidad de las uniones, lo que resulta en más enlaces por unión o cruce, y en más uniones o cruces. La presencia de los hidrolizados condujo a la disminución del carácter elástico de los geles ya que dichos hidrolizados podrían dificultar los reordenamientos entre partículas. Sin embargo, en todos los casos predominó el carácter elástico sobre el viscoso.

Para este sistema, el análisis de la microestructura reveló que a medida que el tiempo de hidrólisis fue mayor, la cantidad de poros se incrementó y los mismos fueron de menor tamaño. Además, la presencia de los hidrolizados en las mezclas contribuirían a que la estructura ordenada de los geles sea más débil, lo que concuerda con los valores de módulo elástico obtenidos.

Estos estudios de las mezclas de los hidrolizados de NaCAS o de WPI con sus proteínas de origen representan un aporte para la evaluación de la posibilidad de aplicación de dichos hidrolizados en la industria alimentaria. Particularmente, los hidrolizados podrían ser incorporados en productos lácteos manufacturados a través de agregación ácida de las CN o WPI. Es necesario evaluar la magnitud del efecto sobre el proceso de gelación para su potencial aporte a la calidad y a la funcionalidad del producto.

4.4. Bioactividad de los productos de hidrólisis

Los hidrolizados de NaCAS ovino con PEP7 evidenciaron mayores actividades antioxidantes en comparación al NaCAS sin hidrolizar, medidas con el método del radical $ABTS^{\cdot+}$. Dicha actividad evaluada a través del método de DPPH mostró similares resultados o incluso menores a los obtenidos con la proteína sin hidrolizar.

El distinto comportamiento por parte de los hidrolizados en los ensayos de secuestro de los radicales $ABTS^{\cdot+}$ y DPPH \cdot se podría explicar por la diferente estereoselectividad de los radicales, distintos péptidos presentes en la muestra capaces de reaccionar y extinguir diferentes radicales y distintas estequiometrías de reacción entre los compuestos antioxidantes en los hidrolizados y los radicales $ABTS^{\cdot+}$ y DPPH \cdot . Además, la habilidad antioxidante de las CN y de los péptidos derivados de las mismas no se basa totalmente en la capacidad para donar hidrógeno y las diferencias en la eficacia de secuestro se pueden atribuir a la solubilidad y difusividad de los radicales. Por lo tanto, una mayor actividad evidenciada por el método ABTS no necesariamente implica un incremento en la habilidad para secuestrar radicales DPPH \cdot .

Los hidrolizados de NaCAS ovino obtenidos con PEP45, presentaron similares resultados en la capacidad de secuestrar al catión radical $ABTS^{\cdot+}$, los cuales mostraron máxima actividad antioxidante luego de las 2 h de hidrólisis resultando en un incremento en un 12,8 % en comparación a su correspondiente proteína de origen sin hidrolizar.

Los hidrolizados de NaCAS ovino con la PEP7, presentaron poder reductor y actividad quelante de Fe^{2+} , alcanzando un máximo para los tiempos de hidrólisis iniciales, para luego disminuir. La capacidad de actuar como dadores de electrones y reducir los intermediarios oxidados de los procesos de peroxidación de lípidos contribuye a la actividad antioxidante. La

quelación del catión ferroso evita la formación de radicales hidroxilos, de esta forma se impide la contribución potencial a enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Además, los metales de transición podrían estimular la peroxidación de lípidos en los alimentos promoviendo de esta forma la rancidez. Como consecuencia, la formación de quelatos de iones metálicos por hidrolizados proteicos puede contribuir a la actividad antioxidante.

Por otro lado, los resultados muestran que, si bien estas capacidades pueden estar presentes en la proteína de partida, un tratamiento de hidrólisis con algún otro propósito (disminuir alergenicidad, mejorar la estabilidad térmica, etc.) no conduciría a la pérdida de dicho poder reductor o quelante del catión ferroso y se alcanzarían múltiples propósitos.

Los hidrolizados de NaCAS bovino obtenidos con PEP7 presentaron mayor habilidad de secuestrar al catión radical $ABTS^{\cdot+}$ en relación al NaCAS sin hidrolizar. La habilidad de secuestrar al radical se incrementó a medida que el tiempo de hidrólisis aumentó. El poder reductor presentó el mismo comportamiento hasta cierto tiempo, para luego disminuir, pero hasta un valor aún mayor que el presentado por la muestra sin hidrolizar. Estos resultados sugerirían que el proceso proteolítico contribuye a las actividades biológicas ensayadas.

Además, los hidrolizados exhibieron un aumento en la actividad quelante de hierro con respecto al control. Se ha reportado que la histidina puede ser considerada como un agente quelante de metales ya que posee un anillo imidazol, la hidrólisis podría incrementar la accesibilidad del metal a los grupos histidina de las CN. Por lo tanto, la hidrólisis del NaCAS podría aumentar la biodisponibilidad del metal. Además, los hidrolizados obtenidos podrían ser utilizados como antioxidantes naturales para prevenir las reacciones de oxidación de los alimentos.

Los hidrolizados de WPI obtenidos por acción de PEP7 mostraron mayor habilidad para secuestrar al catión radical $ABTS^{\cdot+}$ y mayor capacidad de quelar al catión ferroso a mayores tiempos de hidrólisis. Como lo observado para los NaCAS, el proceso proteolítico contribuye a las actividades biológicas ensayadas.

Los hidrolizados de WPI obtenidos por acción de PEP45 se comportaron de forma similar. Se observó un aumento de la actividad secuestradora del catión radical $ABTS^{\cdot+}$ para tiempos crecientes de hidrólisis. No obstante, en comparación a los hidrolizados obtenidos con PEP7, incrementaron levemente dicha actividad biológica con respecto a la actividad de partida a pesar de tratarse de un sistema más concentrado, mostrando ser menos efectivos que sus contrapartes.

Los hidrolizados de NaCAS ovino obtenidos por acción de PEP7 a las 3 h de hidrólisis evidenciaron actividad antibacteriana contra *Bacillus cereus* y *Corynebacterium fimi*. Usualmente, los péptidos antimicrobianos derivados de las proteínas lácteas poseen carácter

anfílico y catiónico, lo que parece ser significativo para su mecanismo de acción dado que se ha propuesto que la etapa inicial de formación de poros en la membrana bacteriana, que conduce a la muerte celular, estaría dada por la unión electrostática entre los péptidos y la membrana cargada negativamente. En general, estos péptidos muestran un amplio rango de actividad frente a microorganismos de importancia para la salud y/o el deterioro de los alimentos. En el caso de los péptidos obtenidos con el PEP7, solo fueron inhibidas bacterias Gram-positivas. Dado que la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas es estructural y funcionalmente más compleja que la de las bacterias Gram-positivas, estas diferencias en la composición de la membrana bacterial podría tener implicancias para el modo de acción y la especificidad bacteriana de estos hidrolizados antibacterianos.

El hidrolizado de NaCAS ovino obtenido por acción de PEP7 a las 3 h de hidrólisis, mostró actividad antifúngica contra *Penicillium expansum* y *Aspergillus fumigatus*, los cuales pueden ocasionar enfermedades en plantas y humanos. Este resultado es de interés ya que han sido reportados pocos estudios sobre actividad antifúngica de péptidos o hidrolizados de proteínas.

Similarmente, los hidrolizados obtenidos a 1 h de acción de PEP45 sobre el NaCAS ovino, presentaron inhibición del crecimiento de *S. enteritidis*, *E. coli*, *C. fimi*, y *L. monocytogenes*, los cuales son microorganismos relacionados con enfermedades transmitidas por los alimentos. Los resultados con PEP45 evidenciaron la inhibición de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Con respecto a la actividad antifúngica, solo los hidrolizados obtenidos luego de 1 h de hidrólisis evidenciaron, además, inhibición del crecimiento fúngico. Fueron inhibidos por estos hidrolizados los hongos fitopatógenos: *F. oxysporum* y *P. expansum* y también el hongo *A. fumigatus*. Estos resultados también podrían tener implicaciones prácticas, debido a que algunas cepas de *F. oxysporum* son responsables en muchas plantas de severos marchitamientos vasculares o de enfermedades de pudrición de la raíz. Por ejemplo, el marchitamiento causado por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* es una de las enfermedades más devastadoras en plantas de tomate. Además, *P. expansum* es considerado una de las principales causas del deterioro postcosecha de peras y manzanas y es frecuentemente aislado en una gran variedad de frutas. Adicionalmente, *A. fumigatus* es la especie más frecuente que causa enfermedad en pacientes fundamentalmente inmunodeprimidos.

Los hidrolizados de NaCAS bovino obtenidos a tiempos 0,5 y 1 h con PEP7 mostraron actividad antibacteriana contra *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* y *Corynebacterium fimi*. Como se mencionó anteriormente, estos resultados son de importancia ya que las bacterias inhibidas son microorganismos relacionados a enfermedades transmitidas por los alimentos.

En general, los hidrolizados proteicos evidenciaron actividad antioxidante (secuestro del catión radical $ABTS^{\cdot+}$, del radical $DPPH^{\cdot}$), poder reductor y capacidad quelante del catión ferroso. Dicha actividad puede proteger a los sistemas biológicos contra el daño vinculado al estrés oxidativo en casos de enfermedad. Estos hidrolizados antioxidantes pueden emplearse para prevenir las reacciones de oxidación, tales como la peroxidación lipídica, que conducen al deterioro de los alimentos.

Además, los hidrolizados, evidenciaron propiedades antimicrobianas contra microorganismos causantes de intoxicaciones alimentarias y del deterioro de los alimentos y que también son patógenos oportunistas, agregando de esta forma calidad y seguridad en los productos alimenticios. Adicionalmente, la inhibición de hongos filamentosos podría representar una aplicación adicional como un nuevo agente antifúngico.

4.5. Efecto de la hidrólisis de las micelas de caseína bovinas por acción enzimática de PEP7 y PEP45

Los resultados indicaron que, aunque se trabajó en un rango moderado de T y pH, la microestructura se vió afectada en una mayor extensión y, bajo condiciones apropiadas PEP7 y PEP45 pueden ser usadas como enzimas coagulantes.

Los productos de hidrólisis obtenidos en el suero post coagulación evidenciaron actividades biológicas, lo que posibilita la transformación de suero, que es generalmente considerado un desecho industrial, en un ingrediente potencial para ser incluido en alimentos funcionales. Aunque existe significativa competición en el mercado, cada tipo de coagulante tiene su uso específico. Por lo tanto, los resultados representan un estudio previo para la utilización de PEP7 y PEP45 como agente coagulante en la manufactura de quesos o productos relacionados.

4.6. Conclusiones generales. Posibles aportes a la industria alimentaria.

Los resultados de esta tesis permitieron conocer cuáles son las condiciones de biodisponibilidad del calcio en relación a la concentración de caseinato. Estas consideraciones son atendibles al momento de la formulación de alimentos suplementados, en especial cuando el mineral de interés es el calcio.

Los *pooles* enzimáticos obtenidos tuvieron la capacidad de hidrolizar el NaCAS bovino y ovino y al WPI, además presentaron habilidad de coagular las micelas de caseína. Estas nuevas preparaciones enzimáticas serían apropiadas para la obtención de péptidos con actividades biológicas o podrían ser usadas como alternativa o en forma conjunta a la quimosina para la manufactura de quesos.

Específicamente, los productos de hidrólisis mostraron actividad antioxidante, poder reductor, actividad quelante y actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos o deteriorantes de alimentos.

La producción de hidrolizados de proteínas lácteas podría ser utilizada en el diseño de nuevos productos alimenticios funcionales, incrementando potencialmente el valor nutricional y la vida de anaquel de los mismos.

Con respecto a la manufactura de quesos, la utilización de las preparaciones requiere investigaciones adicionales con respecto al rendimiento, efecto sobre la maduración y estabilidad de la preparación enzimática durante el almacenamiento.

La contribución de los estudios realizados estaría ligada a la fortificación de alimentos de utilización masiva como son los productos lácteos y su amplio uso como aditivos en otros.

Es esencial el papel que representa el calcio en la homeostasis del hueso a lo largo de la vida, tanto para alcanzar el pico de masa ósea y para mantenerlo en las etapas avanzadas de la vida, como así también el rol preponderante en el control del peso corporal, la hipertensión y la insulino resistencia.

Las proteínas lácteas representan una excelente fuente de ingredientes naturales para su aplicación en alimentos funcionales. Se puede preveer que en un futuro cercano diversos productos innovadores basados en estos ingredientes serán lanzados en el mercado mundial. Los mismos podrían ser dirigidos a infantes, adultos, y personas inmunodeprimidas como así también para prevenir enfermedades crónicas relacionadas con la dieta.

La caracterización y secuenciación de los péptidos involucrados en las propiedades biológicas y su posterior síntesis en grandes cantidades permitiría evaluar con mayor especificidad sus mecanismos de acción, el conocimiento de la formación de los mismos y de su liberación de la proteína precursora.

El desarrollo de productos lácteos con la incorporación de los péptidos obtenidos ofrecería una excelente base para el nuevo concepto de “nutrición personalizada” o nutrigenómica.

CAPÍTULO 5

REFERENCIAS

CAPÍTULO 5: REFERENCIAS

1. Patton, S., Milk: Its remarkable contribution to human health and well-being. **2004**, New Jersey: Transaction Publishers.
2. DuPuis, E.M., Nature's perfect food: How milk became America's drink. **2002**, Nueva York: NYU Press.
3. Thompson, A., M. Boland, and H. Singh, Milk proteins: from expression to food. **2009**: Academic Press.
4. Fox, P.F. and P.L. McSweeney, Dairy chemistry and biochemistry. **1998**, New York: Springer.
5. Jenness, R., Composition of Milk, in Fundamentals of Dairy Chemistry, N. Wong, et al., Editors. **1988**, Springer US. p. 1-38.
6. Swaisgood, H. and P. Fox, Chemistry of the caseins. Advanced dairy chemistry-1: Proteins., **1992**(Ed. 2):63-110.
7. Kosikowski, F.V., Whey Utilization and Whey Products. Journal of Dairy Science, **1979**. 62(7):1149-1160.
8. Morr, C.V. and E.Y.W. Ha, Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, **1993**. 33(6):431-476.
9. Sawyer, L., β -Lactoglobulin, in Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins, P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, Editors. **2003**, Springer US. p. 319-386.
10. McKenzie, H.A. and F.H. White Jr, Lysozyme and α -Lactalbumin: Structure, Function, and Interrelationships, in Advances in Protein Chemistry, F.M.R.J.T.E. C.B. Anfinsen and S.E. David, Editors. **1991**, Academic Press. p. 173-315.
11. Brew, K., α -Lactalbumin, in Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins, P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, Editors. **2003**, Springer US. p. 387-419.
12. Walstra, P. and R. Jenness, Dairy chemistry and physics. Dairy chemistry and physics, ed. Z. Acribia S A (ed). **1984**: New York, USA; John Wiley & Sons. 1-225.
13. Farrell, H.M.J., et al., The caseins of milk as calcium binding proteins, in Calcium binding proteins, Vogel, Editor. **2002**, Humana Press: Totowa, NJ. p. 91-140.
14. Dickinson, E. and G. Stainsby, Colloidal aspects of milk: a case study, in Colloids in food. **1982**, Applied Science Publishers: London and New York. p. 411-423.
15. Guo, C., et al., Casein precipitation equilibria in the presence of calcium ions and phosphates. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **2003**. 29(4):297-307.
16. Farrell, H.M.J., et al., Calcium-induced associations of the caseins: a thermodynamic linkage approach to precipitation and resolubilization. Archives of Biochemistry and Biophysics, **1988**. 265:146-158.
17. Horne, D.S., The kinetics of the precipitation of chemically modified α 1-casein by calcium. Journal of Dairy Research, **1979**. 46:265-293.
18. Holt, C. and L. Sawyer, Primary and predicted secondary structures of the caseins in relation to their biological functions. Protein Engineering, **1988**. 2(4):251-259.
19. Eigel, W.N., et al., Nomenclature of Proteins of Cow's Milk: Fifth Revision1. Journal of Dairy Science, **1984**. 67(8):1599-1631.
20. Ginger, M.R. and M.R. Grigor, Comparative aspects of milk caseins. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, **1999**. 124(2):133-145.
21. Brignon, G., et al., Complete amino acid sequence of bovine α 2S-casein. FEBS Letters, **1977**. 76(2):274-279.

22. Stewart, A.F., et al., Complete nucleotide sequences of bovine alpha S₂- and beta-casein cDNAs: comparisons with related sequences in other species. *Molecular Biology and Evolution*, **1987**. 4(3):231-241.
23. Delfour, A., et al., Caseino-glycopeptides: Characterization of a methionine residue and of the N-terminal sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1965**. 19(4):452-455.
24. Jollès, J., C. Alais, and P. Jollès, The tryptic peptide with the rennin-sensitive linkage of cow's κ -casein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, **1968**. 168(3):591-593.
25. de Kruif, C.G. and C. Holt, Casein Micelle Structure, Functions and Interactions, in *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*, P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, Editors. **2003**, Springer US. p. 233-276.
26. Creamer, L.K. and A.K.H. MacGibbon, Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids. *International Dairy Journal*, **1996**. 6(6):539-568.
27. HadjSadok, A., et al., Characterisation of sodium caseinate as a function of ionic strength, pH and temperature using static and dynamic light scattering. *Food Hydrocolloids*, **2008**. 22(8):1460-1466.
28. Gaucheron, F.L.G., Y.; Boyaval, E.; Piot, M., Binding of cations to casein molecules. Importance of physicochemical conditions. *Milchwissenschaft*, **1997**. 52:322-327.
29. McMahon, D.J. and R.J. Brown, Composition, Structure, and Integrity of Casein Micelles: A Review1. *Journal of Dairy Science*, **1984**. 67(3):499-512.
30. Walstra, P., The voluminosity of bovine casein micelles and some of its implications. *Journal of Dairy Research*, **1979**. 46(02):317-323.
31. Phadungath, C., Casein micelle structure: a concise review. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, **2005**. 27(1):201-212.
32. Riel, R., Composición y estructura físico-química de la leche. *Ciencia y Tecnología de la Leche*, Amiot, J, **1991**:1-53.
33. Horne, D.S., Steric stabilization and casein micelle stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, **1986**. 111(1):250-260.
34. Horne, D.S., Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **2006**. 11(2-3):148-153.
35. de Kruif, C.G., Casein micelle interactions. *International Dairy Journal*, **1999**. 9(3-6):183-188.
36. de Kruif, C.G., et al., Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*, **2012**. 171-172(0):36-52.
37. Fox, P.F. and A. Brodtkorb, The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*, **2008**. 18(7):677-684.
38. Walstra, P., On the Stability of Casein Micelles. *Journal of dairy science*, **1990**. 73(8):1965-1979.
39. Creamer, L.K., et al., Micelle Stability: [κ]-Casein Structure and Function. *Journal of Dairy Science*, **1998**. 81(11):3004-3012.
40. Bloomfield, V.A. and R.J. Mead Jr, Structure and Stability of Casein Micelles1. *Journal of Dairy Science*, **1975**. 58(4):592-601.
41. Dalgleish, D.G., Casein Micelles as Colloids: Surface Structures and Stabilities. *Journal of Dairy Science*, **1998**. 81(11):3013-3018.
42. Holt, C. and L. Sawyer, Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of primary and secondary structures of the α_{S1} -, β - and κ -caseins. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, **1993**. 89(15):2683-2692.
43. Horne, D.S., Casein structure, self-assembly and gelation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **2002**. 7(5-6):456-461.

44. Farrell, H., P. Qi, and V. Uversky. New views of protein structure: applications to the caseins: protein structure and functionality. in ACS symposium series. **2006**: Oxford University Press.
45. Park, Y.W., et al., Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, **2007**. 68(1-2):88-113.
46. Holt, C., The Milk Salts: Their Secretion, Concentrations and Physical Chemistry, in *Developments in Dairy Chemistry—3*, P.F. Fox, Editor. **1985**, Springer Netherlands. p. 143-181.
47. Harper, W.J., Model Food System Approaches for Evaluating Whey Protein Functionality. *Journal of Dairy Science*, **1984**. 67(11):2745-2756.
48. Pilosof, A.M. and G.B. Bartholomai, Caracterización funcional y estructural de proteínas. Ed. Eudeba, Buenos Aires, **2000**.
49. Lucey, J.A., Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels. *Journal of Dairy Science*, **2002**. 85(2):281-294.
50. Dickinson, E., Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions. *Trends in Food Science & Technology*, **1998**. 9(10):347-354.
51. Sabadini, E., M.D. Hubinger, and R.L. Cunha, The effects of sucrose on the mechanical properties of acid milk proteins-k-carrageenan gels. **2006**, scielo. p. 55-65.
52. Home, D.S., Factors influencing acid-induced gelation of skim milk, in *Food colloids: Fundamentals of formulation*. **2001**, Royal Society of Chemistry Cambridge. p. 345-351.
53. Horne, D.S., Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2003**. 213(2-3):255-263.
54. Green, M.L., The formation and structure of milk protein gels. *Food Chemistry*, **1980**. 6(1):41-49.
55. de Kruijff, K.G., et al., Gelation of proteins from milk. *Faraday Discussions*, **1995**. 101(0):185-200.
56. van Vliet, T., C.M.M. Lakemond, and R.W. Visschers, Rheology and structure of milk protein gels. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **2004**. 9(5):298-304.
57. Farrell, J.H.M., et al., Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **2006**. 11(2-3):135-147.
58. Carlson, A., C. Hill, and N. Olson, Kinetics of milk coagulation: I. The kinetics of kappa casein hydrolysis in the presence of enzyme deactivation. *Biotech.Bioeng.*, **1987a**. 29:582-589.
59. Carlson, A., C. Hill, and N. Olson, Kinetics of milk coagulation: II. Kinetics of secondary phase: Micelle flocculation. *Biotech. Bioeng*, **1987b**. 29:590-600.
60. Kalab, M., P. Allan-Wojtas, and B. Phipps-Todd, Development of microstructure in set-style nonfat yoghurt--a review. *Food microstructure*, **1983**.
61. Lucey, J.A., et al., A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono- δ -lactone. *Food Research International*, **1998**. 31(2):147-155.
62. Cavallieri, A.L.F. and R.L. da Cunha, The effects of acidification rate, pH and ageing time on the acidic cold set gelation of whey proteins. *Food Hydrocolloids*, **2008**. 22(3):439-448.
63. Braga, A.L.M., M. Menossi, and R.L. Cunha, The effect of the glucono-[delta]-lactone/caseinate ratio on sodium caseinate gelation. *International Dairy Journal*, **2006**. 16(5):389-398.
64. Barbut, S. and E.A. Foegeding, Ca²⁺-Induced Gelation of Pre-heated Whey Protein Isolate. *Journal of Food Science*, **1993**. 58(4):867-871.

65. Britten, M. and H.J. Giroux, Acid-induced gelation of whey protein polymers: effects of pH and calcium concentration during polymerization. *Food Hydrocolloids*, **2001**. 15(4–6):609-617.
66. Rabiey, L. and M. Britten, Effect of whey protein enzymatic hydrolysis on the rheological properties of acid-induced gels. *Food Hydrocolloids*, **2009**. 23(8):2302-2308.
67. Schanbacher, F.L., et al., Milk-Borne Bioactive Peptides. *International Dairy Journal*, **1998**. 8(5–6):393-403.
68. Korhonen, H. and A. Pihlanto-Leppälä, Milk-derived bioactive peptides: formation and prospects for health promotion. *Handbook of functional dairy products*, **2004**:109-124.
69. Gobetti, M., F. Minervini, and C.G. Rizzello, Bioactive Peptides in Dairy Products, in *Handbook of Food Products Manufacturing*. **2006**, John Wiley & Sons, Inc. p. 489-517.
70. Park, Y.W., Bioactive components in milk and dairy products. **2009**, New York: John Wiley & Sons.
71. McSweeney, P. and P.F. Fox, *Advanced dairy chemistry: volume 3: lactose, water, salts and minor constituents*. **2009**, New Jersey: Springer.
72. Korhonen, H. and A. Pihlanto, Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, **2006**. 16(9):945-960.
73. Korhonen, H.J., Technological and health aspects of bioactive components of milk. *International Dairy Journal*, **2006**. 16(11):1227-1228.
74. Rao, M.B., et al., Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*, **1998**. 62(3):597-635.
75. Hartmann, R. and H. Meisel, Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, **2007**. 18(2):163-169.
76. Silva, S.V. and F.X. Malcata, Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, **2005**. 15(1):1-15.
77. Phelan, M., et al., Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*, **2009**. 19(11):643-654.
78. Sarmadi, B.H. and A. Ismail, Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, **2010**. 31(10):1949-1956.
79. Graveland-Bikker, J.F. and C.G. de Kruif, Unique milk protein based nanotubes: Food and nanotechnology meet. *Trends in Food Science & Technology*, **2006**. 17(5):196-203.
80. Rao, M.B., et al., Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **1998**. 62(3):597-635.
81. Rossini, K., et al., Casein peptides with inhibitory activity on lipid oxidation in beef homogenates and mechanically deboned poultry meat. *LWT - Food Science and Technology*, **2009**. 42(4):862-867.
82. Teixeira, M.L., et al., Purification and characterization of a peptide from *Bacillus licheniformis* showing dual antimicrobial and emulsifying activities. *Food Research International*, **2009**. 42(1):63-68.
83. Zimecki, M. and M.L. Kruzel, Milk-derived proteins and peptides of potential therapeutic and nutritive value. *J Exp Ther Oncol*, **2007**. 6(2):89-106.
84. Miguel, M., et al., Vascular effects and antihypertensive properties of κ -casein macropeptide. *International Dairy Journal*, **2007**. 17(12):1473-1477.
85. Corrêa, A.P.F., D.J. Daroit, and A. Brandelli, Characterization of a keratinase produced by *Bacillus* sp. P7 isolated from an Amazonian environment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **2010**. 64(1):1-6.
86. Daroit, D.J., A.P.F. Corrêa, and A. Brandelli, Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **2011**. 65(1):45-51.

87. Moatsou, G., et al., Casein fraction of ovine milk from indigenous Greek breeds. *Lait*, **2004**. 84(3):285-296.
88. Shalichev, J. and G. Tanev, Isolation, Purification, and Determination of Some Chemical and Physicochemical Characteristics of Sheep Alphas-Casein. *Journal of Dairy Science*, **1973**. 56(2):171-176.
89. Gatti, C.A., E.M. Alvarez, and V.S. Sala, Effect of the Anion Citrate on the Mineral Composition of Artificial Casein Micelles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**. 47(1):141-144.
90. Nespolo, C.R., et al., Effect of Calcium on Ovine Caseinate Functional Properties. *Journal of Chemical & Engineering Data*, **2010**. 55(11):4624-4631.
91. Risso, P.H., et al., Comparative study of the action of anionic and non-ionic hydrophobic fluorescent markers on the enzymic coagulation of heated bovine casein micelles. *Food Hydrocolloids*, **2000**. 14(2):179-185.
92. van de Hulst, H.C., *Light Scattering by Small Particles*, ed. Wiley. **1957**, New York. 729-736.
93. Costa, J.P., Estudio reoóptico de geles ácidos de proteínas lácteas de origen bovino. **2011**, Universidad Nacional de Rosario: Rosario.
94. Peterson, G.L., A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, **1977**. 83(2):346-356.
95. Kuaye, A.Y., An ultraviolet spectrophotometric method to determine milk protein content in alkaline medium. *Food Chemistry*, **1994**. 49(2):207-211.
96. Yang, K. and R. Hogg, Estimation of particle size distributions from turbidimetric measurements. *Analytical Chemistry*, **1979**. 51:758-763.
97. Horne, D.S., Determination of the fractal dimension using turbidimetric techniques. Application to aggregating protein systems. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, **1987**. 83:259-270.
98. Mandelbrot, B.B., *The fractal geometry of nature*. **1983**, New York: Freeman.
99. Worning, P., et al., A Novel Approach to Turbidimetry of Dense Systems: An Investigation of the Enzymatic Gelation of Casein Micelles. *Journal of Colloid and Interface Science*, **1998**. 203(2):265-277.
100. Teixeira, J., Fractal and non-fractal Patterns in Physics, in *On growth and form*, Stanley and Ostrowsky, Editors. **1986**, Martinus Nijhoff Publisher: Dordrecht, The Netherlands. p. 145-162.
101. Holt, C., T.G. Parker, and D.G. Dalgleish, Measurement of particle sizes by elastic and quasi-elastic light scattering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, **1975**. 400(2):283-292.
102. Camerini-Otero, R.D. and L.A. Day, The wavelength dependence of the turbidity of solutions of macromolecules. *Biopolymers*, **1978**. 17(9):2241-2249.
103. Pecora, R., Introduction, in *Dynamic Light Scattering*, R. Pecora, Editor. **1985**, Springer US. p. 1-6.
104. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, **1970**. 227(5259):680-685.
105. Schägger, H. and G. von Jagow, Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, **1987**. 166(2):368-379.
106. Schägger, H., Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protocols*, **2006**. 1(1):16-22.
107. Alvarez, E.M., et al., Calcium-induced aggregation of bovine caseins: effect of phosphate and citrate. *Colloid & Polymer Science*, **2007**. 285(5):507-514.
108. Alvarez, E.M., Efectos de distintos aniones sobre la estructura y estabilidad de micelas de caseína. **2000**, Universidad Nacional de Rosario: Rosario.

109. Mora-Gutierrez, A., H.M. Farrell Jr, and T.F. Kumosinski, Comparison of Calcium-Induced Associations of Bovine and Caprine Caseins and the Relationship of α 1-Casein Content to Colloidal Stabilization: A Thermodynamic Linkage Analysis. *Journal of Dairy Science*, **1993**. 76(12):3690-3697.
110. Moré, J., The Levenberg-Marquardt algorithm: Implementation and theory, in *Numerical Analysis*, G.A. Watson, Editor. **1978**, Springer Berlin Heidelberg. p. 105-116.
111. Alexander, P., R.J. Block, and H.P. Lundgren, *A laboratory manual of analytical methods of protein chemistry (including polypeptides)*. **1960**, Oxford: Pergamon.
112. Richards, E., *An introduction to the physical properties of large molecules in solution*. IUPAB biophysics series, **1980**.
113. Kato, A. and S. Nakai, Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, **1980**. 624(1):13-20.
114. Haskard, C.A. and E.C.Y. Li-Chan, Hydrophobicity of Bovine Serum Albumin and Ovalbumin Determined Using Uncharged (PRODAN) and Anionic (ANS-) Fluorescent Probes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1998**. 46(7):2671-2677.
115. de Kruif, C.G., *Skim Milk Acidification*. *Journal of Colloid and Interface Science*, **1997**. 185(1):19-25.
116. Curcio, S., et al., A rheological approach to the study of concentrated milk clotting. *Rheologica Acta*, **2001**. 40(2):154-161.
117. Pugnali, L.A., L. Matia-Merino, and E. Dickinson, Microstructure of acid-induced caseinate gels containing sucrose: Quantification from confocal microscopy and image analysis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2005**. 42(3-4):211-217.
118. Zheng, C., D.-W. Sun, and L. Zheng, Recent applications of image texture for evaluation of food qualities—a review. *Trends in Food Science & Technology*, **2006**. 17(3):113-128.
119. Gonzales, R.C. and R.E. Woods, *Digital Image Processing*, 2-nd Edition. **2002**, New Jersey: Prentice Hall.
120. Costa, J.P., et al., Texture analysis of milk protein acid gels by image digital analysis from conventional inverted and confocal microscopy. *Bioinformatics Models, Methods and Algorithms* **2011**:322-325
121. Arima, K., J. Yu, and S. Iwasaki, Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt, in *Methods in Enzymology*, L.L. Gertrude E. Perlmann, Editor. **1970**, Academic Press. p. 446-459.
122. Adler-Nissen, J., Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1979**. 27(6):1256-1262.
123. Li, B., et al., Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*, **2007**. 102(4):1135-1143.
124. Re, R., et al., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, **1999**. 26(9-10):1231-1237.
125. Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier, and C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, **1995**. 28(1):25-30.
126. Chang, C.-Y., K.-C. Wu, and S.-H. Chiang, Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. *Food Chemistry*, **2007**. 100(4):1537-1543.
127. Stookey, L.L., Ferrozine---a new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry*, **1970**. 42(7):779-781.
128. Oyaizu, M., Studies on Products of Browning Reaction--antioxidative Activities of Products of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, **1986**. 44(6):307-315.

129. Motta, A. and A. Brandelli, Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology*, **2002**. 92(1):63-70.
130. De Oliveira, S.S., et al., Staphylococcal strains involved in bovine mastitis are inhibited by *Staphylococcus aureus* antimicrobial peptides. *Letters in Applied Microbiology*, **1998**. 27(5):287-291.
131. Mancilla Canales, M.A., et al., Colloidal Stability of Bovine Calcium Caseinate Suspensions. Effect of Protein Concentration and the Presence of Sucrose and Lactose. *Journal of Chemical & Engineering Data*, **2010**. 55(7):2550-2557.
132. Pitkowski, A., T. Nicolai, and D. Durand, Stability of caseinate solutions in the presence of calcium. *Food Hydrocolloids*, **2009**. 23:1164-1168.
133. Dalgleish, D.G., D.S. Horne, and A.J.R. Law, Size-related differences in bovine casein micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1989**. 991(3):383-387.
134. Park, Y.W., et al., Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, **2007**. 68(1-2):88-113.
135. Farrell, H.M., et al., Particle Sizes of Casein Submicelles and Purified κ -Casein, in *Macromolecular Interactions in Food Technology*. **1996**, American Chemical Society. p. 61-79.
136. Fox, P.F. and D.M. Mulvihill. Physico-chemical aspects of dehydrated protein-rich milk products. in *Proceedings of the International Dairy Federations Symposium*. **1983**. Denmark.
137. Cogliati, S., Efecto de la hidrólisis sobre la estabilidad coloidal de caseinato de sodio en presencia de iones de interés biológico, in *Química-Física*. **2013**, Universidad Nacional de Rosario: Rosario.
138. Zhang, L., J. Li, and K. Zhou, Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. *Bioresource Technology*, **2010**. 101(7):2084-2089.
139. Farrell, H., Jr., et al., Particle sizes of purified κ -casein: Metal effect and correspondence with predicted three-dimensional molecular models. *Journal of Protein Chemistry*, **1996**. 15(5):435-445.
140. Belyakova, L.E., et al., Effect of sucrose on molecular and interaction parameters of sodium caseinate in aqueous solution: relationship to protein gelation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2003**. 31(1-4):31-46.
141. Pitkowski, A., D. Durand, and T. Nicolai, Structure and dynamical mechanical properties of suspensions of sodium caseinate. *Journal of Colloid and Interface Science*, **2008**. 326(1):96-102.
142. Hogan, S., et al., Development of antioxidant rich peptides from milk protein by microbial proteases and analysis of their effects on lipid peroxidation in cooked beef. *Food Chemistry*, **2009**. 117(3):438-443.
143. Rival, S.G., C.G. Boeriu, and H.J. Wichers, Caseins and Casein Hydrolysates. 2. Antioxidative Properties and Relevance to Lipoxygenase Inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**. 49(1):295-302.
144. Zhu, Y.P., et al., Improvement of the antioxidant activity of Chinese traditional fermented okara (Meitauza) using *Bacillus subtilis* B2. *Food Control*, **2008**. 19(7):654-661.
145. Pownall, T.L., C.C. Udenigwe, and R.E. Aluko, Amino Acid Composition and Antioxidant Properties of Pea Seed (*Pisum sativum* L.) Enzymatic Protein Hydrolysate Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**. 58(8):4712-4718.
146. Zhu, K., H. Zhou, and H. Qian, Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, **2006**. 41(6):1296-1302.

147. Bottone, E.J., *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, **2010**. 23(2):382-398.
148. Srinivas, S. and V. Prakash, Bioactive Peptides from Bovine Milk α -Casein: Isolation, Characterization and Multifunctional properties. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, **2010**. 16(1):7-15.
149. Minervini, F., et al., Angiotensin I-Converting-Enzyme-Inhibitory and Antibacterial Peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 Proteinase-Hydrolyzed Caseins of Milk from Six Species. *Applied and Environmental Microbiology*, **2003**. 69(9):5297-5305.
150. López-Expósito, I., et al., Identification of antibacterial peptides from ovine α s2-casein. *International Dairy Journal*, **2006**. 16(9):1072-1080.
151. Benkerroum, N., Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. *International Journal of Dairy Technology*, **2010**. 63(3):320-338.
152. Wang, S.-L., et al., Production of antimicrobial compounds by *Monascus purpureus* CCRC31499 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*, **2002**. 31(3):337-344.
153. Jiang, J., et al., Yak milk casein as a functional ingredient: preparation and identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of Dairy Research*, **2007**. 74:18-25.
154. Kelly, S.M., T.J. Jess, and N.C. Price, How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, **2005**. 1751(2):119-139.
155. Daroit, D.J., et al., Characterization of a keratinolytic protease produced by the feather-degrading Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. *Biocatalysis and Biotransformation*, **2010**. 28(5-6):370-379.
156. Hidalgo, M.E., et al., Comparative study of bovine and ovine caseinate aggregation processes: Calcium-induced aggregation and acid aggregation, in *Protein Aggregation*, D.A. Stein, Editor. **2011**, Nova Publishers: Hauppauge, NY. p. In press.
157. Gómez-Ruiz, J., et al., Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC–MS/MS. *European Food Research and Technology*, **2008**. 227(4):1061-1067.
158. Mor-Mur, M. and J. Yuste, *Emerging Bacterial Pathogens in Meat and Poultry: An Overview*. Vol. 3. **2010**, Heidelberg: Springer. 12.
159. Mandal, S., N. Mallick, and A. Mitra, Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, **2009**. 47(7):642-649.
160. Snowdon, A., *A Colour Atlas of Postharvest Diseases of Fruit and Vegetables*. Vol. 1. **1990**, University of Cambridge Press, Wolfe Scientific, Barcelona, Spain.
161. Barrett, A.H. and M. Peleg, Applications of fractal analysis to food structure. *LWT - Food Science and Technology*, **1995**. 28(6):553-563.
162. Hidalgo, M.E., et al., Physicochemical and antioxidant properties of bovine caseinate hydrolysates obtained through microbial protease treatment. *International Journal of Dairy Technology*, **2012**. 65(3):342-352.
163. Hidalgo, M.E., et al., Biological and physicochemical properties of bovine sodium caseinate hydrolysates obtained by a bacterial protease preparation. *Food Hydrocolloids*, **2015**. 43(0):510-520.
164. Mellema, M., et al., Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels. *Advances in Colloid and Interface Science*, **2002**. 98(1):25-50.
165. Corrêa, A.P.F., et al., Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2011**. 91(12):2247-2254.

166. Megías, C., et al., Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. *LWT - Food Science and Technology*, **2008**. 41(10):1973-1977.
167. McCann, K.B., et al., Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine α S1-casein. *International Dairy Journal*, **2006**. 16(4):316-323.
168. Wu, S., et al., Simultaneous production of multi-functional peptides by pancreatic hydrolysis of bovine casein in an enzymatic membrane reactor via combinational chromatography. *Food Chemistry*, **2013**. 141(3):2944-2951.
169. Arruda, M.S., et al., New peptides obtained by hydrolysis of caseins from bovine milk by protease extracted from the latex *Jacaratia corumbensis*. *LWT - Food Science and Technology*, **2012**. 49(1):73-79.
170. Alting, A.C., et al., Physical and Chemical Interactions in Cold Gelation of Food Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**. 50(16):4682-4689.
171. de Castro, R.J.S. and H.H. Sato, Advantages of an acid protease from *Aspergillus oryzae* over commercial preparations for production of whey protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **2014**. 3(3):58-65.
172. O'Loughlin, I.B., et al., Pilot-scale production of hydrolysates with altered bio-functionalities based on thermally-denatured whey protein isolate. *International Dairy Journal*, **2014**. 34(1):146-152.
173. Zhongyang, D., et al., Production of milk-clotting enzyme by *Bacillus subtilis* B1 from wheat bran. *African Journal of Biotechnology*, **2011**. 10(46):9370-9378.
174. Jaros, D., K. Seitler, and H. Rohm, Enzymatic coagulation of milk: animal rennets and microbial coagulants differ in their gelation behaviour as affected by pH and temperature. *International Journal of Food Science & Technology*, **2008**. 43(9):1721-1727.
175. Montgomery, D.C., Design and analysis of experiments. **2008**, New York: John Wiley & Sons.
176. Tukey, J.W., One degree of freedom for non-additivity. *Biometrics*, **1949**. 5(3):232-242.
177. Apesteguía, A., et al. Coagulación enzimática de leche bovina por acción de endopeptidasas de origen bacteriano. in XIV Congreso y XXXII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. **2012**. Rosario.
178. Apesteguía, A., et al. Estudio de la coagulación enzimática de micelas de caseína bovina inducida por endopeptidasas segregadas por *Bacillus* sp. P45. in IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICYTAC2012). **2012**. Córdoba.
179. Horne, D.S., Determination of the fractal dimension using turbidimetric techniques. Application to aggregating protein systems. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, **1987**. 83(0):259-270.
180. Mancilla Canales, M., et al. Modelización fisicomatemática de la interacción entre micelas de caseína y enzimas bacterianas. in 99ª Reunión Nacional de la Asociación Física Argentina **2014**. Tandil, Buenos Aires.
181. Gobbetti, M., et al., Latent Bioactive Peptides in Milk Proteins: Proteolytic Activation and Significance in Dairy Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2002**. 42(3):223-239.
182. Korhonen, H. and A. Pihlanto, Bioactive peptides: new challenges and opportunities for the dairy industry. **2003**, Melbourne: Dairy Industry Association of Australia. 6.
183. Korhonen, H. and A. Pihlanto-Lepp, Milk protein-derived bioactive peptides : Novel opportunities for health promotion : Dairy nutrition for a healthy future. **2001**, Bruselas: International Dairy Federation.
184. Kudoh, Y., et al., Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO13953. *Japanese Society of Food Science and Technology*, **2001**. 48(1):44-50.

185. Hernández-Ledesma, B., et al., Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2005**. 85(6):1041-1048.
186. Meir, S., et al., Determination and Involvement of Aqueous Reducing Compounds in Oxidative Defense Systems of Various Senescing Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1995**. 43(7):1813-1819.
187. Juntachote, T. and E. Berghofer, Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galangal. *Food Chemistry*, **2005**. 92(2):193-202.
188. Díaz, M., et al., Use of Caseinophosphopeptides as Natural Antioxidants in Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**. 51(8):2365-2370.