



**Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla**

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**Evaluación de propiedades funcionales de proteína
concentrada de suero tratada por ultrasonido de
potencia.**

**Tesis presentada como requisito para obtener el
título de:**

Licenciatura en Ingeniería en Alimentos

Presenta:

Ana Karen Armenta Ortega

Director de Tesis:

M.C. Héctor Ruíz Espinosa

Puebla, Pue. Septiembre 2016



BUAP

Oficio No. FIQ/AC/333/2016
Asunto: Registro de Tema de Tesis

**C. ANA KAREN ARMENTA ORTEGA
PASANTE DE LA LICENCIATURA
EN INGENIERÍA EN ALIMENTOS
P R E S E N T E:**

Por medio del presente me permito informarle, de la aprobación del Registro de Tema de Tesis de la Licenciatura en Ingeniería en Alimentos cuyo título es el siguiente:

“EVALUACIÓN DE PROPIEDADES FUNCIONALES DE PROTEÍNA CONCENTRADA DE SUERO TRATADA POR ULTRASONIDO DE POTENCIA”

Con el siguiente contenido:

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1	ANTECEDENTES
CAPÍTULO 2	METODOLOGÍA
CAPÍTULO 3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA**

Director de Tesis: M. C. HÉCTOR RUÍZ ESPINOSA
Co- Director de tesis: DRA. GEORGETTE REBOLLAR PÉREZ

Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será **ÚNICAMENTE POR UN AÑO**.

A T E N T A M E N T E
“Pensar Bien, Para Vivir Mejor”
H. Puebla de Z., 16 de Marzo del 2016

Tita Vazquez
M.I.C. MA. GPE. TITA VAZQUEZ E. DE MONTERO
SECRETARIA ACADÉMICA



C.c.p Director de Tesis: M. C. HÉCTOR RUÍZ ESPINOSA
Co- Director de tesis: DRA. GEORGETTE REBOLLAR PÉREZ
Minutario Facultad de Ingeniería Química

60
AÑOS DE
AUTONOMÍA
UNIVERSITARIA

Facultad
de Ingeniería
Química

Av. San Claudio s/n, Col. San
Manuel, Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00
Ext. 7250 y 7251



**Benemérita Universidad Autónoma de
Puebla**
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA

C.P. José Juan Morales Rodríguez
Director de la Administración Escolar
De la BUAP.
Presente

ASUNTO:
AUTORIZACIÓN
IMPRESIÓN DE TESIS

Por este conducto me permito presentar a Ud. al C. pasante de la carrera de Ingeniería en Alimentos:

Ana Karen Armenta Ortega

Quién presenta como tema de tesis:

Evaluación de propiedades funcionales de proteína concentrada de suero tratada por ultrasonido de potencia

La cual ha sido debidamente revisada y se autoriza para su impresión correspondiente.

Sin otro particular y para los fines que se estimen conducentes reitero mi distinción.

ATENTAMENTE

“Pensar Bien, para Vivir Mejor”

H. Puebla de Z., a 23 de agosto de 2016

Director de Tesis
M.C. Héctor Ruiz Espinosa

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Dios por darme la fortaleza suficiente para salir adelante durante esta etapa, por darme salud y paciencia para alcanzar este objetivo; además que me otorgó el motor más importante de mi vida que son mis padres Felipe y Maru, a los cuales les agradezco infinitamente todo lo que han hecho por mí; no me han dejado sola desde que tengo uso de razón, siempre están motivándome, apoyándome y brindándome todo su amor y cariño incondicional sin pedirme nada a cambio; son mi mayor orgullo, los mejores padres y por ellos lucho para salir adelante ya que sé es su mayor ilusión, los amo mucho. Agradezco también a mi hermano Luis Felipe, el cual a pesar de las peleas también le ha tocado apoyarme y estar ahí cuando más lo necesito, gracias por apoyarme y regañarme cuando también lo necesito.

A mis abuelos María Inés, Trinidad, Raúl y Miguel, los cuales me siento dichosa de tener, ya que al igual que mis padres siempre han estado conmigo en todo momento y nunca me dejan sola, al contrario me llenan de buenos consejos y amor; gracias por hacerme la nieta más feliz de este mundo, son los mejores abuelos que me pudieron tocar, los amo mucho. A todos mis tíos y primos, que también son base fundamental y apoyo en mi vida, gracias por su apoyo, cariño y paciencia conmigo, además de gratos momentos felices a su lado, los quiero mucho.

A mi novio Lamoní, que le ha tocado vivir esta etapa de mi vida muy de cerca, gracias por tu paciencia, amor y ayuda brindada durante este tiempo, has estado tanto en los buenos como en los malos momentos y eso es algo que valoro demasiado, te has convertido en un pilar importante en vida y quiero que sigamos construyendo esta bonita historia con nuestras metas realizadas juntos, te amo mucho.

A mis amigas las SEIS, las cuales adoro demasiado, tantas aventuras, charlas entre clases, paseos, viajes, de todo hemos vivido juntas, espero seamos amigas hasta viejitas y seamos damas de honor en nuestras bodas, gracias a cada una por brindarme su amistad y cariño, siempre estarán en mi corazón, las quiero muchísimo Hill, Sol, Clari y Oli. A mis amigas de la carrera de alimentos Vicky, Liz, Kary, Mary, Lupita, Ani, Jovita, gracias por todos los buenos momentos compartidos, por sus enseñanzas y por todo su apoyo durante este transcurso de mi vida, espero sigamos saliendo y no nos olvidemos, que nuestra amistad perdure mucho tiempo más, gracias por brindarme su amistad y cariño, las quiero mucho mis pequeñas IAL.

Agradezco a mi director de tesis, M.C. Héctor Ruíz, el cual además de maestro ha sido mi guía durante toda la carrera, gracias por todo su apoyo, paciencia y aprendizaje que me ha dejado en mi corazón; agradezco a mi co-asesora Dra. Georgette Rebollar por todo su apoyo y paciencia, por estar al pendiente de mí y guiarme en este trabajo, además de ser excelentes profesores, son excelente personas, un placer trabajar con ustedes.

Gracias a mis sinodales Dr. Irving Ruíz y Dr. Juan José Luna por sus enseñanzas, sugerencias y comentarios que me permitieron fortalecer este trabajo, además a la Dra. María Elena Ramos, por su tiempo y paciencia hacia este trabajo. A mis profesores de la carrera, por todas sus enseñanzas, gracias por enseñarme el sentido de la responsabilidad y la constancia para ser mejor persona. A la Mtra. Lilia Sánchez por apoyarme en pruebas de electroforesis. Gracias a todos mis compañeros de clase con los cuales he compartido buenos momentos, a todos muchas gracias.

Karen Armenta

Índice

Introducción.....	1
Objetivo general	3
Objetivos específicos.....	3
Hipótesis.....	3
1. Antecedentes	4
1.1. Definición de leche	4
1.2. Composición general	4
1.3. Proteínas de la leche	4
1.3.1. Caseínas.....	5
1.3.2. Proteínas de suero de leche.....	6
1.3.2.1. β -Lactoglobulina.....	7
1.3.2.2. α -Lactoalbúmina.....	9
1.3.2.3. Albúmina bovina sérica	9
1.3.2.4. Inmunoglobulinas	10
1.4. Suero de leche.....	11
1.5. Productos comerciales de proteínas de suero de leche	13
1.6. Propiedades funcionales de las proteínas.....	15
1.6.1. Capacidad espumante	15
1.6.2. Capacidad de retención de agua	16
1.6.3. Formación de geles.....	17
1.7. Desnaturalización proteica.....	18
1.8. Factores que afectan la desnaturalización.....	18
1.8.1. Tratamientos térmicos	19
1.8.2. Tratamientos mecánicos	19
1.8.3. Procesamiento a alta presión	20
1.8.4. pH.....	21
1.9. Ultrasonido.....	21
1.9.1. Cavitación acústica.....	22
1.9.2. Tipos de sonificadores	23
1.9.3. Reacciones químicas.....	25
1.9.4. Aplicaciones de ultrasonido de alta intensidad en concentrados proteicos.....	26
2. Metodología	28
2.1. Preparación de la muestra	28

2.2.	Ultrasonido.....	29
2.3.	Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	31
2.4.	Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).....	33
2.5.	Formación de gel inducida por calor	34
2.6.	Firmeza de gel.....	34
2.7.	Análisis estadístico de datos	35
3.	Resultados y Discusión	36
3.1.	Preparación de la muestra	36
3.2.	Ultrasonicación de potencia.....	36
3.3.	Concentración proteica por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	38
3.4.	Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).....	41
3.5.	Formación y firmeza de gel	47
	Conclusiones.....	52
	Trabajo futuro	53
	Bibliografía.....	54
	Anexos.....	62
	Anexo 1. Determinación de potencia real efectiva por calorimetría	62
	Anexo 2. Elaboración de curva de calibración de β -LG.....	63
	Anexo 3. Análisis de datos de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y firmeza de gel mediante regresión polinomial cuadrática.	65
	Anexo 4. Análisis de superficies de respuesta con respecto a FG.....	66

Índice de tablas

Tabla 1. Composición general de leche bovina.....	4
Tabla 2. Propiedades físicas y químicas de las caseínas y proteínas de suero.	5
Tabla 3. Composición (g/L) de suero ácido y dulce.....	12
Tabla 4. Aplicaciones de suero de leche en alimentos.	13
Tabla 5. Información nutrimental de Lacprodan 80.....	29
Tabla 6. Tratamientos de ultrasonido a los tiempos y temperaturas seleccionados.	31
Tabla 7. Gradiente de elución binario	32
Tabla 8. Niveles de cada variable a considerar para superficies de respuesta de FG.....	35
Tabla A1.1. Capacidad específica de componentes de WPC 80 a diferentes concentraciones (kJ/kg °C)	62
Tabla A1.2. Capacidad específica y potencia real efectiva de dispersiones de WPC 80	62
Tabla A2.1. Áreas bajo la curva obtenidas a diferentes concentraciones de β -LG pura	63
Tabla A3.1. Valores de regresión obtenidos para HPLC	65
Tabla A3.2. Valores de regresión obtenidos para firmeza de gel.....	65
Tabla A4.1 Firmeza de gel modelo obtenida mediante el análisis de regresión del modelo empleado.....	66

Índice de figuras

Figura 1. Modelo de nanoclusters de Holt	6
Figura 2. Estructura general de β -Lactoglobulina	8
Figura 3. Estructura general de α -Lactoalbúmina	9
Figura 4. Estructura general de albúmina bovina sérica.....	10
Figura 5. Estructura general de las inmunoglobulinas	11
Figura 6. Principio de ultrafiltración	14
Figura 7. Cambios fisicoquímicos durante la formación de la red de gel viscoelástico durante el calentamiento de proteínas de suero nativas.....	18
Figura 8. Cambios en la estructura de β -LG presurizada	21
Figura 9. Proceso de cavitación.....	23
Figura 10. Baño ultrasónico	24
Figura 11. Homogeneizador ultrasónico	24
Figura 12. Transductor piezoeléctrico ultrasónico	25
Figura 13. Diagrama general de trabajo.	28
Figura 14. Lacprodan 80.....	29
Figura 15. Equipo de ultrasonido Hielscher UP400S.....	31
Figura 16. Cromatógrafo Agilent Infinity 1260	32
Figura 17. Unidad de electroforesis Mini-Bio Rad	33
Figura 18. Texturómetro Texture Technologies TAXT-Plus.....	34
Figura 19. Preparación de dispersión coloidal de WPC 80 a 15% (p/v)	36
Figura 20. Ultrasonido de dispersiones coloidales de WPC.....	37
Figura 21. Porcentaje de desnaturalización de β LG-A (a) y de β LG-B (b) en dispersiones coloidales tratadas por US a tiempos y temperaturas selectos	40
Figura 22. Regresión cuadrática de β -LG (ppm).....	41
Figura 23. Análisis de bandas de tratamientos de ultrasonido a dispersiones de 15% (p/v)..	44
Figura 24. Análisis de bandas de tratamientos de ultrasonido a dispersiones de 20% (p/v)..	45
Figura 25. Porcentaje de proteína desnaturalizada de los tratamientos de US; A) α -LA y B) β -LG	46
Figura 26. Formación de geles de tratamientos de US.....	47
Figura 27. Tiempo de formación de geles de tratamientos de US, A) 15% y B) 20%..	48

Figura 28. Firmeza de gel de tratamientos de ultrasonido.....	50
Figura 29. Regresión cuadrática de firmeza de gel	50
Figura 30. Superficies de respuesta de firmeza de gel, $X_3=1$ (20%) y $X_3=-1$ (15%)....	51
Figura A2.1. Curvas de calibración β LG-A y β LG-B.....	64

Introducción

A pesar de su alto contenido nutricional, el suero fue considerado durante largo tiempo un producto de desecho de la producción de queso. Tomando en cuenta este enfoque, las industrias queseras buscaron métodos de bajo costo para deshacerse de éste, arrojándolo en ríos, lagos y océanos, vendiéndolo como alimento para animales o utilizándolo como fertilizante en el campo. Todos estos enfoques para la gestión de suero de leche se han basado en la premisa de que este subproducto lácteo era un desecho con poco valor, y por lo tanto tenía que ser eliminado de la manera más económica. Sin embargo, en la actualidad, la aplicación de distintas disciplinas científicas, enfoques y técnicas modernas han ayudado a tener una mayor comprensión a nivel molecular de las características físicas, biológicas y nutricionales de los componentes del suero, en particular de péptidos y proteínas. Este avance se ha extendido a un mayor conocimiento de las interacciones entre los componentes de suero de leche, y la influencia de estas interacciones en la funcionalidad de los mismos (Smithers, 2008).

Una gran parte del suero de leche (alrededor del 70% de la producción anual) se utiliza para obtener suero deshidratado (WP); del porcentaje restante se obtiene lactosa y solo una pequeña parte se destina a la obtención de concentrados (WPC) y aislados proteicos (WPI), esto es debido a que se necesitan técnicas más avanzadas como es la ultrafiltración para obtener concentrados de proteínas de calidad (Božanić *et al.*, 2014).

Los sueros WP, WPC y WPI son típicamente empleados como ingredientes en la formulación de diversos tipos de alimentos, dadas sus características funcionales versátiles y debido a un conjunto de propiedades sensoriales que intervienen poco en el *flavor* de productos elaborados con éstos (Božanić *et al.*, 2014). En nuestros días, una de las principales tendencias en el desarrollo de ingredientes alimenticios responde a la necesidad de los consumidores por contar con productos que exhiban funcionalidades y atributos únicos, por ejemplo, mejor capacidad espumante, capacidad de retención de agua incrementada, etc.; esto a su vez, le brinda alternativas a las compañías de alimentos procesados para crear productos que se diferencien claramente de su competencia y se adapten más a los requerimientos del mercado.

La aplicación del suero de leche tanto líquido como en polvo para la formulación de nuevos productos va en aumento, ya que sus propiedades funcionales tales como formación de geles, capacidad espumante y capacidad de retención de agua han ayudado

a mejorar características sensoriales y tecnológicas de diversos alimentos. La funcionalidad del suero depende de las propiedades fisicoquímicas de la estructura de sus proteínas destacando tamaño, forma, composición de aminoácidos, secuencia, hidrofobicidad y flexibilidad (Dissanayake, 2011). Para incrementar su aplicación en alimentos se puede modificar su funcionalidad; para ello, se requiere un cambio estructural, el cual se da generalmente a través de su desnaturalización, lo que conlleva a modificar la estructura secundaria y terciaria de las proteínas por la ruptura de enlaces de baja energía sin romper los enlaces peptídicos covalentes (la mayoría de los cuales se encuentran conformando la estructura primaria). La proteína de principal interés en el suero es la β -Lactoglobulina (β -LG) debido a que es la mayoritaria y la principal responsable de sus propiedades funcionales. Existen diversos métodos para la desnaturalización de β -LG incluyendo la aplicación de calor y la disminución de pH; sin embargo, nuevas tecnologías emergentes como la alta presión han sido recientemente exploradas como alternativas de proceso que ayuden a propiciar cambios estructurales proteicos distintos a los identificados con barreras tradicionales.

Una de las tecnologías no térmicas que se han aplicado en investigación y en procesos industriales alimentarios selectos es el ultrasonido (US). El US, cuyas aplicaciones en alimentos han aumentado sensiblemente en la última década, consiste en la propagación de ondas ultrasónicas perceptibles al oído humano capaces de modificar la estructura de las moléculas contenidas en una matriz alimenticia. Esta tecnología que ha sido aplicada en diversas áreas, es usada principalmente en el área de lácteos propiciando cambios en actividad enzimática, inactivación microbiana, disminución del tamaño de glóbulo graso y desnaturalización de proteínas en leche y otros productos lácteos fluidos (Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2008; Ertugay *et al.*, 2004; Villamiel *et al.*, 1999).

Recientemente, algunos autores han profundizado acerca de cambios de propiedades funcionales en WPC a través del US de potencia a diferentes amplitudes, principalmente en propiedades espumantes y emulgentes (Jambrak *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2015). Además, han reportado cambios en propiedades gelificantes con WPC a concentraciones del 5 y 10% (p/v) (Chandrapala *et al.*, 2011). Sin embargo, los estudios de aplicación de US en concentrados de proteínas de suero de leche (WPC) son escasos a concentraciones mayores de 15%, además de que el estudio de la desnaturalización de las proteínas, principalmente de β -LG ha sido escasamente reportada; de aquí se deriva el

interés de profundizar en la aplicación del US en dispersiones coloidales con altas concentraciones de WPC para cuantificar la magnitud de desnaturalización de las proteínas séricas (principalmente β -LG), identificar una posible formación de agregados y relacionar la formación de éstos con cambios en propiedades funcionales selectas, principalmente formación y firmeza de geles.

Objetivo general

Evaluar la aplicación de ultrasonido de potencia en dispersiones coloidales de concentrado de proteínas de suero (WPC 80) como medio para modificar sus propiedades funcionales, asociando estos cambios a la formación de agregados proteicos.

Objetivos específicos

- Definir parámetros limitantes de concentración de dispersiones coloidales de proteína de suero de leche (WPC 80) y condiciones preliminares de sonicación (tiempo y temperatura).
- Seleccionar tratamientos de sonicación dispersiones coloidales de proteína concentrada de suero (WPC 80) con base en la modificación estructural de proteínas séricas analizadas mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).
- Evaluar las propiedades funcionales (formación y firmeza de geles) de dispersiones ultrasonicadas de WPC.

Hipótesis

La aplicación de ultrasonido de potencia para el procesamiento de una dispersión de proteína concentrada de suero (WPC 80) puede inducir la formación de agregados proteicos, los cuales a su vez modificarán propiedades funcionales selectas del mismo, incluyendo capacidad de gelificación y firmeza de geles.

1. Antecedentes

1.1. Definición de leche

En el mundo existen diferentes definiciones de leche, debido a las normas oficiales de cada país. La definición de leche según el Reglamento Oficial Mexicano de leches la define como: “El producto natural obtenido por la ordeña completa de uno o más animales sanos, con exclusión del producto obtenido 15 días antes del parto y cinco días después de este acto, o cuando no contenga calostro”(Revilla, 1982).

1.2. Composición general

La composición de la leche puede variar debido a diversos factores como: Especie y raza del animal, etapa de lactancia, temporada, alimentación y tipo de ordeño. En general, la Tabla 1 muestra el contenido de los diversos nutrientes en la leche.

Los nutrientes en la leche se encuentran en tres estados físicos, los cuales son:

- Solución: Lactosa y minerales.
- Coloide: Caseínas, proteínas séricas y glóbulos de grasa de tamaño menor
- Suspensión: Enzimas, proteínas complejas de suero y glóbulos de grasa grandes.

Componentes	Porcentajes (%)
Agua	87
Proteína	3.5
Grasa	3.8
Lactosa	4.9
Cenizas	0.8

Fuente: Walstra *et al.*, (2005)

1.3. Proteínas de la leche

De los principales componentes de la leche, las proteínas son de suma importancia ya que son el mayor constituyente en la dieta que ayudan al crecimiento y la formación de

músculos. Las proteínas de leche se clasifican en dos tipos: caseínas y proteínas de suero de leche, las cuales representan el 80 y 20%, respectivamente, del contenido de proteína total. En la Tabla 2 se muestran de manera general las propiedades fisicoquímicas de las caseínas y proteínas de suero de leche.

Tabla 2. Propiedades físicas y químicas de las caseínas y proteínas de suero.		
Propiedad	Caseínas	Proteínas de suero
Tipo de proteína	α -caseína β -caseína κ -caseína	α -lactalbúmina (α -LA) β -lactoglobulina (β -LG) Albúmina bovina sérica (BSA) Inmunoglobulinas
Estado físico en leche	Largos agregados coloidales en forma de micelas.	Monómeros o pequeñas estructuras cuaternarias.
Peso molecular	Micela de caseína: $\sim 10^8$ Da	α -LA: ~ 14 kDa β -LG: ~ 18 kDa BSA: ~ 66 kDa
Punto isoeléctrico	pH: ~ 4.6	pH: ~ 5
Solubilidad a pH 4.6	Insoluble	Soluble
Estabilidad térmica	Muy estable, comienza a desnaturalizarse arriba de 140°C durante 20-25 minutos.	Completamente desnaturalizada a 90°C por 10 min.
Composición de aminoácidos	Contiene altos niveles de prolina repartidos en las estructuras α - y β -. Bajo contenido de sulfuro y principalmente contiene residuos de metionina, muy poca cisteína.	Estructura compleja. No fosforilada. Rica en sulfuro, contiene cisteína. El número de enlaces disulfuro y grupos tiol (SH) respectivamente son: α -La: 4 y no presenta grupo SH β -LG: 2 y 1 grupo SH BSA: 17 y 1 grupo SH

Adaptado de Fox & McSweeney (1998)

1.3.1. Caseínas

Las caseínas (CNs) son un grupo de fosfoproteínas que se caracterizan por ser termorresistentes, hidrofóbicas y carecer de estructuras secundarias y terciarias; su estructura primaria la hace flexible y la falta de estructura secundaria la hace una

estructura abierta, por lo que expone las partes hidrófobas de la cadena de aminoácidos dando hidrofobicidad superior en su cara sur (Fox & Kelly, 2006; Gallegos, 2015). Además, ésta estructura abierta hace a las caseínas más vulnerables a la proteólisis por diversas enzimas, especialmente la pepsina, ya que tienen fácil acceso (Swaisgood, 2003).

En la leche, las CNs se encuentran en forma de micelas de CN, las cuales contienen 4 tipos de CNs: α 1-, α 2-, β - y κ -CN, generalmente se distribuyen en las proporciones 40, 10, 40 y 10%, respectivamente, de la caseína total (Dalglish, 1993).

Se han propuesto varios modelos acerca de la estructura de las micelas de CN siendo el más reciente el Modelo nanoclusters de Holt (Figura 1), en el cual menciona que la micela de CN es considerada una matriz homogénea de CNs en la cual nano agregados de fosfato de calcio coloidal (FCC) (tamaño aproximado de 2 nm) se encuentran dispersos a distancias aproximadas de 18.6 nm. En la micela, las CNs se asocian entre ellas a través interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, enlaces iónicos, enlaces de Van der Waals, entre otros, formando una malla polimérica de proteínas (De Kruif *et al.*, 2012) donde α 1-, α 2- y β - son altamente hidrofóbicas y susceptibles a la precipitación por calcio además se encuentran en el interior de la micela, mientras que la κ -CN se localiza en la periferia debido a que posee una fracción hidrofílica que sobresale de la misma, limitando el proceso de asociación de las CNs y cumpliendo una doble función de estabilización por impedimento estérico y por su actividad de superficie (Walstra *et al.*, 2005).

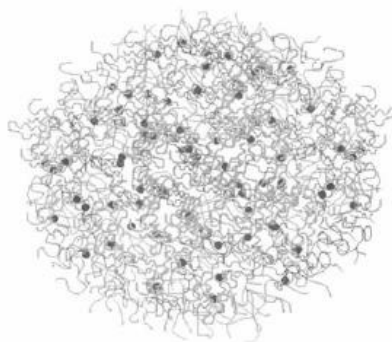


Figura 1. Modelo de nanoclusters de Holt

1.3.2. Proteínas de suero de leche

Por otro lado, las proteínas de suero de leche son una mezcla de β -lactoglobulina (β -LG), α -lactoalbúmina (α -LA), albúmina bovina sérica (BSA), inmunoglobulinas (IG), proteosa peptona y en menor cantidad lactoperoxidasa y lactoferrina (Fitzsimons *et al.*, 2007).

Las proteínas de suero son estructuras complejas de tercer y cuarto orden, las cuales representan alrededor del 20% de contenido de proteína total en leche. Las fuerzas responsables de mantener éstas estructuras son puentes disulfuro, interacciones hidrofóbicas, enlaces iónicos, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (Singh y Havea, 2003).

La composición nativa de las proteínas de suero las hace ser altamente solubles en leche. Esto se debe a la larga proporción de residuos hidrofílicos en la superficie de las estructuras globulares y al alto contenido de puentes disulfuro; además, su estructura globular las hace ser resistentes contra la proteólisis enzimática y ácida (Dissanayake y Vasiljevic, 2009).

Investigaciones recientes se han centrado en la mejora de la estabilidad térmica de las proteínas de suero para incrementar su uso en una gama más amplia de productos alimenticios. Los investigadores han elegido varios enfoques para mejorar la estabilidad térmica de las proteínas, incluyendo el control del tamaño de agregados de proteínas mediante la adición de azúcar, la reticulación enzimática, la quelación de minerales y el US; o la modificación de proteínas de suero para evitar la agregación a través de chaperones moleculares, hidrólisis enzimática, repulsión electrostática, la conjugación con hidratos de carbono y la encapsulación de proteínas (Burrington, 2012). Las características generales de cada proteína se presentan a continuación.

1.3.2.1. β -Lactoglobulina

β -Lactoglobulina (β -LG) es la proteína más abundante en el suero de leche la cual representa alrededor del 50% de las proteínas de suero de leche. En su estructura primaria cuenta con una secuencia de 162 aminoácidos residuales de los cuales 84 son aminoácidos esenciales; su temperatura de desnaturalización es de 78°C (Dissanayake, 2011). Existen 10 variantes genéticas de β -LG conocidas, sin embargo, las dos variantes comunes que se encuentran frecuentemente son β LG-A y β LG-B, de las cuales su diferencia radica en dos aminoácidos (A/B las secuencias diferentes son Asp₆₄/Gly₆₄ y Val₁₁₈/Ala₁₁₈) (De Wit, 2009; Hinrichs y Rademacher, 2004).

Se trata de una proteína globular, ya que sus cadenas polipeptídicas están plegadas estrechamente de tal forma que adopta una forma esférica o globular, dejando los grupos hidrofílicos hacia el exterior. El centro de la molécula es hidrofóbico, por lo que es capaz de fijar moléculas como colesterol y retinol (Coto, 2014; Hernández-Rojas y Velez-Ruiz, 2014).

β -LG está constituida por una serie de estructuras: primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria (Figura 2). La estructura primaria viene determinada por la secuencia de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos, además presenta dos puentes disulfuro entre cuatro aminoácidos de cisteína lo que le proporciona estabilidad. Por otro lado, existe un quinto aminoácido de cisteína libre, con el grupo tiol (-SH) expuesto, el cual tiene una función importante en la estructura cuaternaria para que se lleve a cabo la agregación (Coto, 2014).

La estructura secundaria es la forma en la que la cadena polipeptídica se pliega en el espacio gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre los átomos que forman el enlace peptídico. Esta proteína presenta dos estructuras secundarias llamadas hélice α y hoja plegada β antiparalela (Coto, 2014).

La β -LG es una estructura cuaternaria que puede encontrarse como monómero, mantenida por dos puentes disulfuro; el grupo tiol libre que presenta se encuentra en la posición Cys121, el cual es muy importante para la formación de dímeros a través de un tercer puente disulfuro entre las cisteínas libres de los dos monómeros. En la leche de los rumiantes la proteína se encuentra en forma de dímeros mientras que en las demás especies se encuentra en forma de monómeros. La formación del trímero tiene lugar por fuerzas débiles como puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, el tetrámero por la unión de dos dímeros, el pentámero por la unión de un monómero a un tetrámero y, por último, el octámero se forma por la unión de 4 dímeros; éste es el mayor agregado posible dentro de la estructura cuaternaria (Liu *et al.*, 2007).

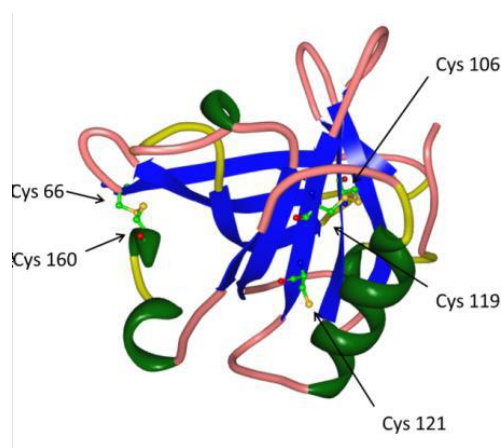


Figura 2. Estructura general de β -Lactoglobulina

1.3.2.2. α -Lactoalbúmina

α -Lactoalbúmina (α -LA) representa el 3.5% de las proteínas totales de leche y el 25% de las proteínas de suero de leche; está formada por 123 aminoácidos residuales. Tiene un peso molecular alrededor de 14 kDa y su punto isoelectrico es de pH 4.8. En su forma nativa, α -LA es un monómero con 4 puentes disulfuro entre los aminoácidos 6 y 120, 28 y 111, 61 y 77, y 73 y 91. Sin embargo, el enlace disulfuro más sensible es el 6 y 120 debido a que es el enlace menos estable (Considine *et al.*, 2007). Mientras tanto la ausencia de grupos tiol la hace ser más estable al calor además de que tiene una configuración estable entre pH 5.4-9. Presenta una gran afinidad con el calcio y otros minerales como zinc, magnesio, cadmio, cobre y aluminio (Fox *et al.*, 2015; Parra, 2009).

Su estructura terciaria es globular y se mantiene por cuatro puentes disulfuro, con una zona de hélice α y otra de hojas plegadas β (Figura 3). Su temperatura de desnaturalización es de 64°C. α -LA tiene un ion calcio unido, que es imprescindible en el mantenimiento de su estructura y de su actividad como reguladora de la galactosiltransferasa. La eliminación del calcio genera una estructura llamada glóbulo fundido (*molten globule*) que es un estado intermedio de la desnaturalización, en el que la proteína mantiene su estructura secundaria pero con una estructura terciaria poco definida (Coto, 2014).

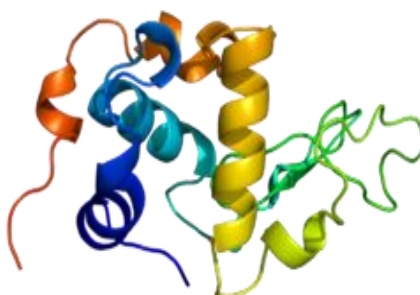


Figura 3. Estructura general de α -Lactoalbúmina

1.3.2.3. Albúmina bovina sérica

Albúmina bovina sérica (BSA) representa del 5-10% del contenido de proteína total en leche; se compone de 582 aminoácidos residuales con un peso molecular de 66 kDa, su punto isoelectrico es de pH 5.3 y su temperatura de desnaturalización es de 64°C.

Cuenta con 17 puentes de disulfuro intramoleculares y un grupo tiol libre en la posición Cis34 (Thompson *et al.*, 2009).

Su estructura tridimensional se compone de tres dominios, cada uno de ellos formado por 10 segmentos helicoidales (Figura 4). Su estructura secundaria en su forma nativa principalmente es α -helicoidal; además, en función del pH presenta diferentes estados de isomerización (Coto, 2014).

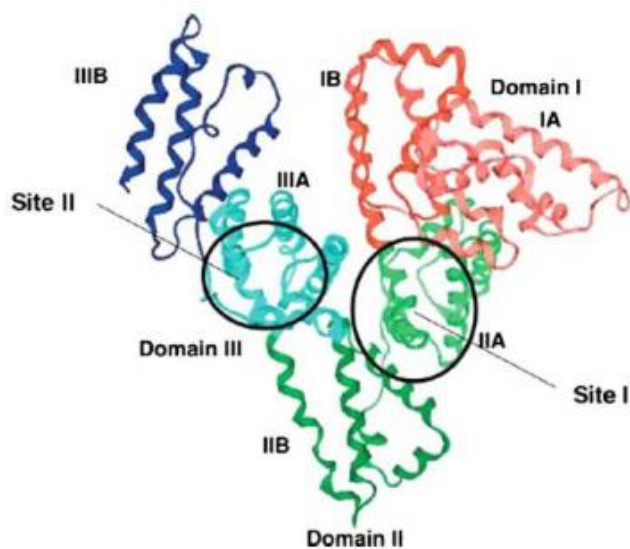


Figura 4. Estructura general de albúmina bovina sérica

1.3.2.4. Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas (Igs) son un grupo de glicoproteínas séricas de movilidad electroforética variable; están formadas por cadenas polipeptídicas agrupadas en uno o más unidades estructurales básicas dependiendo del tipo de inmunoglobulina (Bernal y Jelen, 1985). Son el menor componente proteínico en el suero de leche.

Cada unidad está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas unidas entre sí por puentes disulfuro y otras uniones de tipo no covalente. Además se encuentra un componente glucosídico que representa del 2 al 14% del peso total de la molécula denominado cadena J. Existen diferentes tipos de Ig, las cuales son IgG, IgD, IgE, IgA e IgM (Figura 5). La que se encuentra en mayor proporción es la IgG, representando casi el 70% de las inmunoglobulinas totales (Marshall y Harper, 1988).

Su estructura básica con forma de Y, está constituida por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Las cadenas ligeras están formadas por 200 aminoácidos residuales, mientras que las pesadas por 400 aminoácidos residuales. Cada cadena ligera está unida

a una cadena pesada por un puente disulfuro, mientras que las dos cadenas pesadas se unen mediante dos puentes disulfuro (Coto, 2014).

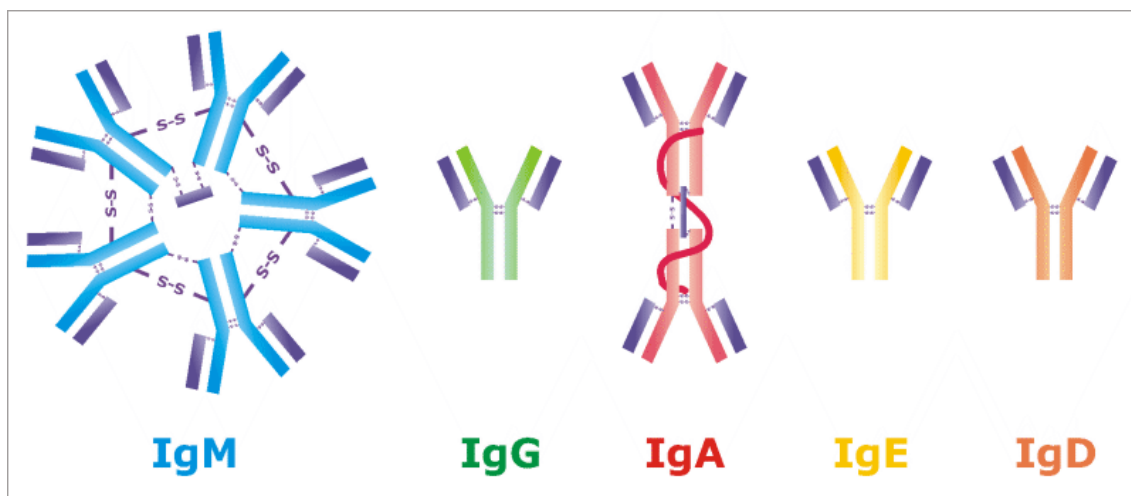


Figura 5. Estructura general de las inmunoglobulinas

1.4. Suero de leche

El suero de leche es un subproducto lácteo obtenido de la fabricación del queso a través de la coagulación de las caseínas. En general, por cada 100 L de leche utilizada para la fabricación de quesos, se producen 80-90 L de suero de leche (Božanić *et al.*, 2014). El suero ha sido reconocido como una fuente esencial de aminoácidos; sin embargo, también representa uno de los mayores problema ambientales (Dissanayake, 2011). Se puede dividir en dos tipos de acuerdo al método de coagulación de leche utilizado:

- Suero dulce. Es el resultado de la acción proteolítica de enzimas coagulantes sobre las micelas de CN de la leche, las cuales catalizan la ruptura del enlace peptídico de la κ -CN entre los aminoácidos fenilalanina en la posición 105 y metionina en la posición 106, provocando la precipitación de las CNs para obtener el queso. Presenta un pH de 5.9-6.6 y es el suero utilizado por la industria al tener una composición más estable (Coto, 2014).
- Suero ácido. Proviene de la coagulación ácida (láctica) de micelas de CN en su punto isoeléctrico (pI) (pH 4.6), lo cual conlleva su desmineralización, desestabilización y precipitación, dejando dispersas a las proteínas séricas. El suero ácido es separado en la fabricación de quesos ácidos y posee un pH de 4.3-4.6 (Coto, 2014).

En la Tabla 3 se muestra la composición de los tipos de suero; la principal diferencia entre estos es el contenido de calcio, fosfato y ácido láctico. El calcio coloidal es más soluble en un ambiente ácido, por consiguiente cuando se lleva a cabo una coagulación ácida parte del calcio coloidal comienza a disolverse y pasa a formar parte del suero. Sin embargo el suero dulce contiene glicomacropéptidos formados por la hidrólisis enzimática de κ -caseína.

Tabla 3. Composición (g/L) de suero ácido y dulce (Jelen, 2003)

Componente	<i>Suero dulce</i>	<i>Suero ácido</i>
Sólidos totales	63.0-70.0	63.0-70.0
Lactosa	46.0-52.0	44.0-46.0
Proteínas	6.0-10.0	6.0-8.0
Calcio	0.4-0.6	1.0-2.0
Fosfatos	1.0-3.0	2.0-4.5
Cloruros	1.1	1.1
Grasa	3.1-5.0	2.7-4.0

Debido a sus propiedades nutricionales y funcionales, el suero de leche se ha convertido en materia prima conveniente para diferentes productos alimenticios. Se ha establecido que es posible transferir diversas propiedades funcionales del suero de leche a nuevos productos alimenticios. Por tal motivo se ha incrementado el uso de proteínas de suero de leche como ingredientes en alimentos (Morr y Ha, 1993). En la Tabla 4 se muestran algunos usos del suero de leche en la industria alimenticia, así como el beneficio que tiene añadir el suero.

Además de ser utilizado como ingrediente en alimentos, se ha comprobado que contiene compuestos biológicamente activos y péptidos bioactivos definidos, como fragmentos específicos de proteínas, que tienen un impacto positivo sobre funciones o condiciones corporales los cuales tienen una influencia sobre la salud humana, más allá de una nutrición normal y adecuada. Estos péptidos son resistentes a la acción de peptidasas digestivas, lo que les permite su absorción y paso al torrente sanguíneo sin ninguna alteración estructural para ejercer determinados efectos biológicos y fisiológicos (Poveda, 2013).

Tabla 4. Aplicaciones de suero de leche en alimentos.

Aplicación en	Beneficios
Productos de panadería	Incrementa el valor nutricional, funciona como emulgente, da cuerpo a la masa, reemplaza la adición de huevo.
Quesos	Incrementa el valor nutricional, funciona como gelificante, mejora propiedades sensoriales, mejora la consistencia, incrementa la cohesividad.
Bebidas	Mejora la solubilidad, la viscosidad y tienen una mayor estabilidad coloidal.
Postres	Da cuerpo y textura a los productos.
Confitería	Facilita el batido y funciona como emulgente.
Productos cárnicos	Funciona como gelificante, mejora la capacidad de retención de agua, mejora la solubilidad.

Adaptado de Poveda, (2013)

1.5. Productos comerciales de proteínas de suero de leche

Los productos comerciales de proteínas de suero de leche generalmente son usados en la industria alimenticia de manera que se incorporan en los productos como ingredientes funcionales (Morr y Foegeding, 1990). La presentación en la que se encuentran es en forma de polvos, los cuales suelen dividirse en concentrados y aislados proteicos. La producción anual de los concentrados y aislados es acerca de 600,000 toneladas (Damodaran *et al.*, 2008).

Los concentrados proteicos (WPC) contienen alrededor del 85% de proteínas, bajos niveles de grasa y lactosa. Sin embargo, la grasa y lactosa presente en los WPC's pueden causar un efecto en las propiedades funcionales y en la calidad de la proteína. El contenido de grasa afecta a la formación de espuma y la lactosa en conjunto con la proteína puede provocar reacciones de pardeamiento no enzimático o afectar en la textura en productos congelados por la formación de cristales (Morr y Ha, 1993).

El WPC se prepara por el método de ultrafiltración/diafiltración, mediante el cual se remueven agua, lactosa y minerales del suero dando como resultado una separación selectiva de proteínas de suero bajo las condiciones del proceso (temperatura y pH). La

diferencia fundamental en el proceso de diafiltración es que se emplea agua libre de sales para eliminar la mayor cantidad de sales y lactosa y obtener concentrados proteicos arriba de 65% (Figura 6). De la ultrafiltración del suero se obtienen usualmente retenidos del 24% de sólidos totales y en la diafiltración se obtienen retenidos alrededor del 28% de sólidos totales (Fox *et al.*, 2015).

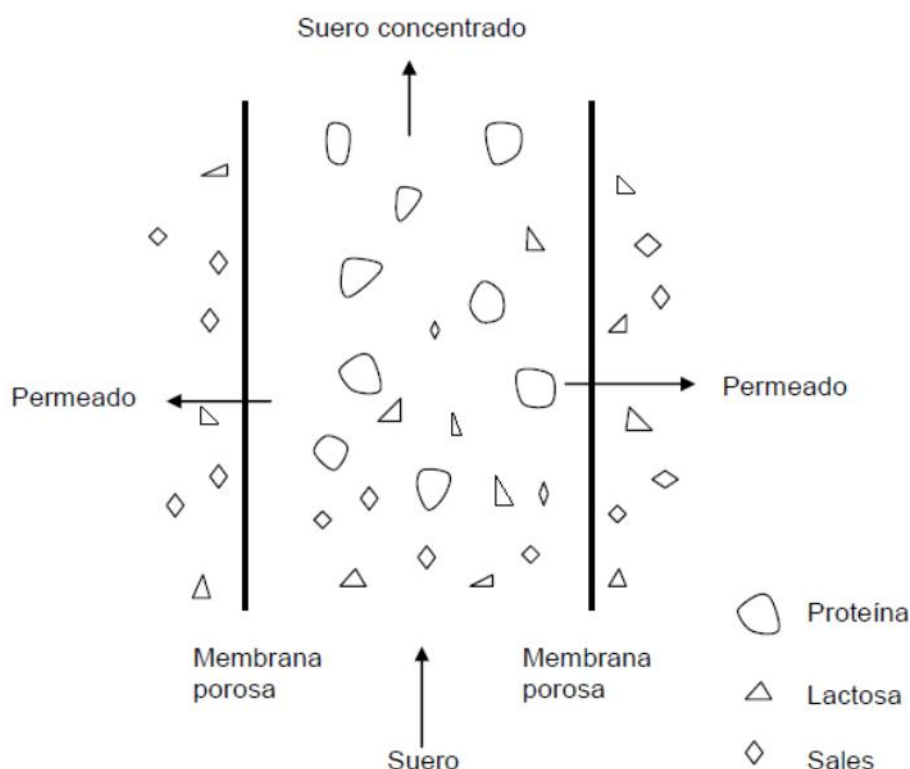


Figura 6. Principio de ultrafiltración (Fox *et al.*, 2015)

En la producción de WPI, se emplean métodos cromatográficos de intercambio iónico o de microfiltración adicionales. Después de obtener el retenido se realiza un secado por aspersión para producir los polvos de WPC y WPI respectivamente (Fox *et al.*, 2015; Morr y Ha, 1993). La tecnología de membrana, incluyendo ultrafiltración, diafiltración y adsorción de intercambio iónico utilizado en estos procesos ha sido de gran utilidad en la producción de diferentes productos de proteína de suero de leche con una composición variada y excelente funcionalidades (Damodaran *et al.*, 2008).

Los WPCs poseen excelentes propiedades funcionales tales como gelificación, capacidad de retención de agua, capacidad espumante, dispersabilidad, viscosidad y emulsificación, además de características sensoriales deseables que les permite ser utilizado en numerosas aplicaciones alimentarias incluyendo bebidas deportivas,

productos horneados, carnes procesadas, pastas, aderezos para ensaladas, patés y salsas, cremas de café, sopas, helados, confitería, alimentos infantiles y otros productos lácteos (Fitzsimons *et al.*, 2007; Onwulata y Tomasula, 2004).

El proceso de ultrafiltración no desnaturaliza las proteínas del suero, por lo que las propiedades funcionales de WPCs permanecen intactas (Marquardt *et al.*, 1985). Se utilizan principalmente para la formulación de alimentos bajos en grasa, debido a su facilidad de gelatinización sin la presencia de calor, además de afectar la retención o liberación del sabor (Johnson, 2004).

El proceso de secado por spray afecta la composición y las propiedades funcionales del producto final, como por ejemplo la solubilidad de la α -lactoalbúmina y de la β -lactoglobulina (Anandharamakrishnan *et al.*, 2008).

1.6. Propiedades funcionales de las proteínas

Las propiedades funcionales son características fisicoquímicas intrínsecas de cada proteína que determinan las características de los alimentos en los cuales se encuentran o a los cuales son agregados. Se clasifican en tres:

- Propiedades de hidratación (interacción proteína-agua): Solubilidad, viscosidad, dispersabilidad, capacidad de retención de agua y adhesión.
- Propiedades relacionadas con interacción proteína-proteína: Formación de geles.
- Propiedades relacionadas con interacción de fases inmiscibles: Propiedades emulsificantes y espumantes (Badui, 2006).

Debido a que la finalidad de los concentrados proteicos es la de mejorar las propiedades sensoriales tales como textura, además de obtener un mejor rendimiento de los productos sin afectar las mismas, las propiedades de mayor importancia son: capacidad espumante, capacidad de retención de agua y formación de geles, las cuales a continuación se describirán.

1.6.1. Capacidad espumante

Las espumas consisten en una fase continua líquida y en una fase dispersa gaseosa; para formar espumas estables los principales factores a considerar son la cantidad de

grupos sulfhidrilo, la flexibilidad molecular, hidrofobicidad y actividad superficial (Lee *et al.*, 1992).

Las características de formación de espuma óptimas de las proteínas dependen de la eficiencia con que se difunden a la interfaz recién formada, disminución de la tensión interfacial y la formación de películas cohesivas y viscoelásticas por polimerización principalmente a través de enlaces disulfuro e interacciones hidrófobas (Bouaouina *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 1992; Monahan *et al.*, 1993).

Al aumentar la relación de β -LG a α -LA, la tensión de fluencia de la espuma de los productos de proteína de suero puede ser modificada (Foegeding *et al.*, 2002). Los grupos sulfhidrilo, que son más activos a pH 7, contribuyen a la flexibilidad molecular, mientras que los puentes disulfuro contribuyen a la rigidez. La flexibilidad molecular mejora la formación de espuma mediante el aumento de la tasa de despliegue en la interfase y permite una alineación más favorable de los grupos polares y no polares en su fase preferida. A pH 7, las proteínas de suero de leche tienen una carga neta negativa, pero a pH 8, posiblemente debido a la oxidación de grupo tiol, forman fácilmente enlaces disulfuro. Las proteínas a un pH apropiado con el aumento de carga negativa neta se repelen entre sí creando una barrera para el enfoque de cerca de gotas, retardando de este modo la velocidad de coalescencia y que resulta en emulsiones más estables (Klemaszewski y Kinsella, 1991).

1.6.2. Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua (CRA), es la capacidad de una proteína para absorber el agua y mantenerla contra la fuerza de la gravedad dentro de una matriz proteica. Esta propiedad es probablemente más importante que la capacidad de unión de agua; aunque las dos propiedades están relacionadas positivamente. Existen propiedades ligadas a éste término que son sinónimos como son capacidad de hidratación, hinchazón y absorción.

Esta propiedad de las proteínas contribuye en última instancia a los atributos de textura deseables para la mayoría de aplicaciones de alimentos tales como productos de panadería, postres y sustitutos de la carne. Además es un factor crítico en la funcionalidad de las proteínas, ya que afecta las propiedades sensoriales de los productos. La temperatura se correlaciona negativamente con la capacidad de retención de agua de la

proteína ya que los enlaces de hidrógeno no son estables a temperaturas elevadas (Damodaran *et al.*, 2008).

Otros factores que afectan la CRA son la concentración proteica, el pH, la fuerza iónica, la presencia de otros componentes como polisacáridos, lípidos y sales, y las condiciones de almacenamiento (Zayas, 1996).

1.6.3. Formación de geles

La formación de geles juega un papel importante en la preparación y aceptabilidad de algunos alimentos como huevo, vegetales y otros productos. Pero no únicamente son utilizadas para la formación de geles sólidos viscoelásticos en alimentos, sino que también mejoran la capacidad de retención de agua, firmeza, adhesión, emulsión y estabilidad de espuma. En general, la formación de geles por calor de las proteínas está gobernada por un balance entre fuerzas de atracción y repulsión (Figura 7) (Zisu *et al.*, 2010). El proceso implica una serie de reacciones fisicoquímicas, tales como la disociación, la desnaturalización, la exposición de los residuos hidrofóbicos y la polimerización resultante a través de la formación de enlaces intermoleculares disulfuro, hidrófobo, de hidrógeno y enlaces iónicos (Brandenberg *et al.*, 1992).

La agregación se puede manejar por diversos métodos como cambios en condiciones ambientales (pH, temperatura, fuerza iónica, composición del solvente) o por la adición de agentes como enzimas y desnaturalizantes. La agregación de proteínas es la etapa primordial de la formación de geles; ésta es gobernada por las estructuras moleculares de las proteínas las cuales determinan la interacción con el solvente o con otras proteínas. Por otro lado, las proteínas regularmente gelan cuando cambia su punto isoelectrico, por ejemplo, a valores de pH lejos del punto isoelectrico, éstas previenen la formación de geles debido a que la fuerza de repulsión electrostática es fuerte entre las moléculas; sin embargo, si el pH es cercano al punto isoelectrico o si se añade sal, las proteínas tienden a agregarse y se forman geles. Además la adición de iones multivalentes como el Ca^{+2} , promueven la gelificación ya que forman puentes salinos entre grupos aniónicos sobre las moléculas (Weiss *et al.*, 2011).

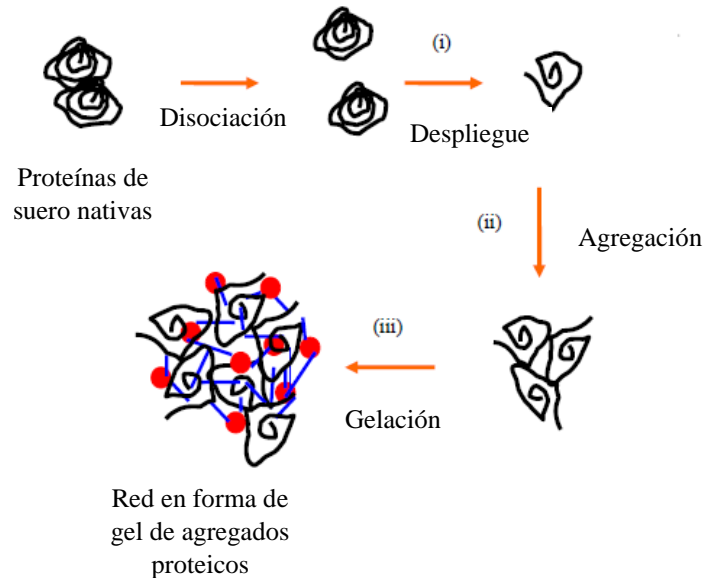


Figura 7. Cambios fisicoquímicos durante la formación de la red de gel viscoelástico durante el calentamiento de proteínas de suero nativas (Alting *et al.*, 2003)

1.7. Desnaturalización proteica

En la desnaturalización de proteínas se pasa de un estado ordenado a un estado desordenado, rompiendo los enlaces de baja energía destacando puentes disulfuro, fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno, sin romper ningún enlace peptídico. Se producen modificaciones en la conformación de las proteínas y desenmascaramiento de zonas hidrofóbicas, dando como resultado el despliegue de la molécula.

Desde el punto de vista nutricional, se modifica la digestibilidad: en general la digestibilidad aumenta, ya que al desplegarse quedan más sitios expuestos al ataque de las proteasas. La digestibilidad puede disminuir si el despliegue de la proteína va seguido de agregación. Uno de los principales efectos de la desnaturalización es la modificación de las propiedades funcionales de las proteínas tales como viscosidad, solubilidad, capacidad de retención de agua, capacidad de gelificación, capacidad emulsificante y capacidad espumante (Lupano, 2007).

1.8. Factores que afectan la desnaturalización

Existen diversos factores que afectan al proceso de desnaturalización, la mayoría ayuda a que el proceso se lleve de forma más rápida, sin embargo no existe un control de la formación de agregados, lo cual puede provocar efectos no deseados en los alimentos. A continuación se presentan los factores más importantes.

1.8.1. Tratamientos térmicos

En los tratamientos térmicos suaves (temperaturas hasta 100°C o ligeramente superiores) se rompen uniones de baja energía, como puentes hidrógeno, y se refuerzan las interacciones hidrofóbicas.

El despliegue de una proteína nativa con los grupos hidrofóbicos en el interior provoca la exposición de estos grupos al medio. La cocción de ciertas proteínas vegetales o animales produce con frecuencia un aumento de digestibilidad por desenmascarar sitios de hidrólisis. Si hay interacciones hidrofóbicas proteína-proteína, lo que puede ocurrir si el grado de despliegue es elevado, se produce agregación la cual puede ocasionar una disminución de la solubilidad y la precipitación de la proteína (Lupano, 2007). A temperaturas más bajas (67.5-75°C), comienza el despliegue de las moléculas de proteína, mientras que, a temperaturas más altas (75-90°C) el proceso de agregación llega a su máxima velocidad (Considine *et al.*, 2007; De Wit, 1990).

La desnaturalización de β -LG por tratamiento térmico se produce por una serie de pasos, los cuales son (Coto, 2014):

- A temperaturas comprendidas entre 40-55°C se producen cambios reversibles en la estructura de la proteína.
- Cuando la β -LG alcanza temperaturas próximas a 65°C, la estructura de la proteína se despliega parcialmente en un estado de “glóbulo fundido”. Este proceso se puede acelerar si la temperatura se eleva a 90°C, sin embargo, si la temperatura disminuye por debajo de los 60°C puede entrar en un estado reversible.
- La agregación es irreversible cuando excede la temperatura de 90°C, logrando la exposición de grupos tioles, favoreciendo las interacciones proteína-proteína.

1.8.2. Tratamientos mecánicos

Los tratamientos mecánicos pueden provocar cambios en las uniones de las proteínas, por ejemplo durante la formación del gluten en el amasado, cuando se producen reacciones de intercambio $\text{SH} \leftrightarrow \text{S-S}$. La ruptura y formación de puentes disulfuro durante el estiramiento de la masa puede resultar en un aumento de la extensibilidad en la dirección del estiramiento (Lupano, 2007).

La trituración en seco de preparaciones proteicas (concentrados o aislados) produce polvos, mejorando la capacidad de absorción de agua. Generalmente aumenta la solubilidad, y se modifican las propiedades espumantes y la absorción de aceite. Si se aplican fuerzas de cizallamiento importantes, como en la extrusión o en el hilado, puede haber modificaciones en la estructura cuaternaria (Lupano, 2007).

1.8.3. Procesamiento a alta presión

Las altas presiones (100-1000 MPa) afectan diversos componentes de los alimentos, así como también a sistemas biológicos, como microorganismos. Darros (2003) menciona que las altas presiones son utilizadas para romper principalmente interacciones hidrofóbicas y electrostáticas; por lo cual, son la causa del despliegue de las moléculas de proteínas, ya sea por completo o de forma parcial; en contraste, la desnaturalización por calor causa formación y destrucción de puentes de hidrógeno, los cuales producen malos olores. Cheftel (1995) menciona que generalmente la alta presión induce la ruptura de enlaces salinos, debido a la electrostricción (alineación compacta de moléculas de agua alrededor de los grupos cargados eléctricamente recién formados) además de romper una parte de enlaces hidrofóbicos (alineación y reducción de volumen de las moléculas agua cerca de los grupos hidrofóbicos). Por el contrario, los puentes de hidrógeno parecen estar reforzados bajo presión (debido a la disminución de volumen).

El comportamiento de los sistemas alimentarios bajo la influencia de la alta presión se rige por el principio de Le Chatelier, el cual menciona que los cambios de presión en la matriz alimenticia hacen que pierda el equilibrio con el exterior, ocupando un volumen menor.

De las proteínas mayoritarias del suero lácteo, β -LG es la más sensible a los tratamientos con alta presión (Patel *et al*, 2005). Estos tratamientos producen el desplegamiento de β -LG tal como se muestra en la Figura 8; por otro lado, α -LA es menos sensible a la presión comparado con β -LG, debido a que su estructura molecular es más rígida por la presencia de un mayor número de puentes disulfuro intramoleculares (4 frente a 2) y sitios de unión al Ca^{+2} .

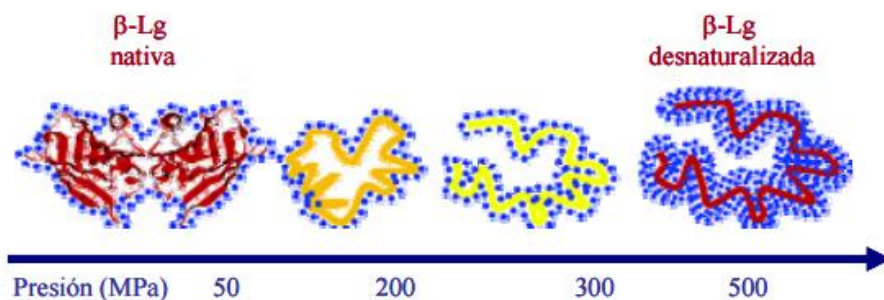


Figura 8. Cambios en la estructura de β -LG presurizada

1.8.4. pH

Otro factor importante el cual favorece la desnaturalización proteica es el pH. La mayoría de las proteínas precipitan a su punto isoelectrico (pI), ya que al tener una carga neta cero, las proteínas no se repelen entre sí, favoreciendo así la agregación proteica. Esta precipitación es reversible en general, salvo en algunos casos como el de la caseína. En este caso se forma un coágulo ácido, desestabilizándose la estructura y perdiendo minerales (Lupano, 2007).

Cuando el pH es mayor que el pI, las proteínas suelen desplegarse ampliamente debido al aumento de la repulsión electrostática y la reactividad de los grupos tiol (Foegeding *et al.*, 2002), posteriormente provocando la agregación para mantener la estabilidad termodinámica. β -LG sufre un cambio conformacional entre pH 7 y 8.5 incluyendo replegamiento de las cadenas de proteínas colectivamente conocido como *transición Tanford* causando una mayor reactividad de los grupos tiol.

Además del pH, la estabilidad de las proteínas se ve afectada por el tipo de acidulante; la selección de un acidulante es importante en el control de la naturaleza de agregación. Diferentes acidulantes, tales como los ácidos láctico, cítrico y fosfórico afectan la temperatura de desnaturalización de las proteínas de suero de leche y tienen capacidad para producir geles de proteínas de suero de leche con diferentes características (Resch *et al.*, 2005). Además, las sustancias quelantes de calcio pueden mejorar la estabilidad térmica de las proteínas de suero de leche, en este caso los ácidos cítrico y fosfórico (De Rham y Chanton, 1984).

1.9. Ultrasonido

El ultrasonido (US) consta de ondas elásticas cuya frecuencia se transmite sobre el umbral del oído humano (aproximadamente 20 kHz) (Mason *et al.*, 2005). Se pueden

distinguir tres tipos de ondas: longitudinales, que se desplazan en el sentido de ordenamiento de las partículas; de tipo esquiroleo, que se mueven de forma perpendicular a tal ordenamiento; y las de tipo Rayleigh, que viajan muy cercanas a la superficie (Mulet *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista industrial, el US se puede dividir en dos grandes grupos: Ultrasonido de baja intensidad (UBI) y ultrasonido de alta intensidad (UAI).

El UBI utiliza frecuencias más altas que 100 kHz e intensidades por debajo de 1 W/cm² y es utilizado como una técnica de análisis y monitoreo de varios alimentos durante el procesamiento y almacenamiento; por ejemplo, permite estudiar y caracterizar la matriz de quesos madurados durante su maduración (Nassar *et al.*, 2010). Se considera un tratamiento no destructivo ya que las ondas ultrasónicas no causan daños físicos ni químicos permanentes en el alimento.

El UAI comprende potencias mayores a 1 W/cm² y frecuencias entre 20 y 100 kHz. En este tipo de US el fenómeno de cavitación puede afectar las propiedades físicas y químicas de los alimentos, así como destruir o alterar las paredes celulares de los microorganismos y enzimas (Feng *et al.*, 2011). Algunas de las aplicaciones reportadas en la industria de los alimentos son: homogenización, corte, extracción, inactivación de microorganismos, inactivación/activación de enzimas, secado, cristalización, entre otros (Chemat y Khan, 2011). El UAI es utilizado para modificar procesos o productos, mientras que el UBI se aplica para diagnóstico (Condón *et al.*, 2005).

1.9.1. Cavitación acústica

Cuando una onda ultrasónica se propaga en un medio líquido de forma longitudinal, se crean ciclos de compresión y expansión alternados. En el momento donde la presión es negativa en el líquido, creada por el ciclo de compresión y expansión alternados, logra ser lo suficientemente menor para superar las fuerzas intermoleculares, formando pequeñas burbujas. Durante el ciclo de expansión y compresión, las burbujas de gas se expanden y contraen simultáneamente. Esta formación y la evolución del tamaño de éstas se conocen como cavitación (Figura 9) (Condón *et al.*, 2005).

Las burbujas generadas por la cavitación se pueden dividir en dos tipos (Gallegos, 2015):

- Cavitación estable, es aquella en la cual el tamaño de las burbujas se mantiene en equilibrio durante muchos ciclos de presión acústica, permitiéndoles existir por un largo tiempo y suficiente para formar nubes de burbujas.

- Cavitación transitoria, también conocida como inercial, son burbujas que existen por periodos de tiempo muy cortos, a veces menores a un ciclo, y se caracterizan por colapsar violentamente.

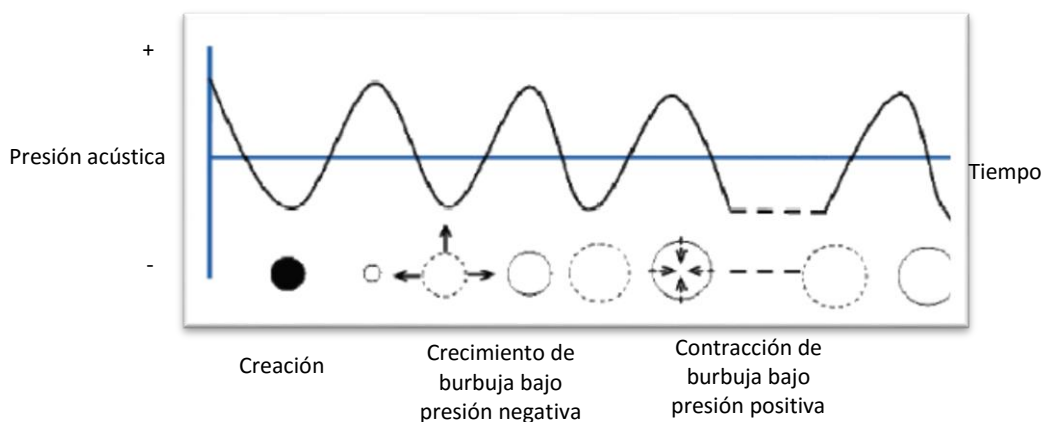


Figura 9. Proceso de cavitación (Zheng y Sun, 2006)

Los factores que afectan la cavitación son: las propiedades físicas del solvente, la temperatura, la frecuencia de irradiación, la presencia de gases disueltos, la limpieza del sistema de reacción, la frecuencia del US, la presión hidrostática, la tensión superficial y la potencia de irradiación (Young, 1989).

1.9.2. Tipos de sonicadores

Baño ultrasónico

Inicialmente se han realizado numerosos estudios de sonoquímica empleando baños ultrasónicos de limpieza, dado que son accesibles y de bajo costo. Sin embargo, este equipamiento tenía ciertos inconvenientes que luego fueron resueltos mediante el desarrollo de baños ultrasónicos específicos para su uso en sonoquímica.

Estos baños ultrasónicos están diseñados con un transductor de área grande en la base y un sistema externo de termostatación (Figura 10).

La reacción se realiza directamente dentro del baño y, por lo tanto, está sujeta a sonicación directa. El campo acústico es más uniforme a lo largo del sistema, ya que se emplea una superficie de emisión plana. Las frecuencias empleadas son más altas que las empleadas en las sondas ultrasónicas (Arzeni, 2014).

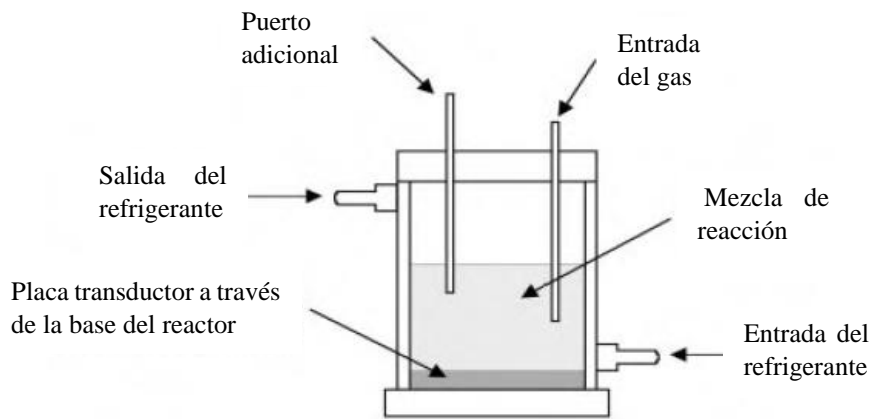


Figura 10. Baño ultrasónico

Homogeneizador ultrasónico

Este tipo de homogeneizador genera el efecto de cavitación mediante el movimiento de un líquido. El material a procesar es forzado a alta velocidad por la bomba del homogeneizador a través de un orificio especial por el que emerge como un chorro que impacta sobre una hoja de acero. Hay dos formas por medio de las cuales ocurre la cavitación en este sistema. Primero mediante el efecto Venturi, el líquido rápidamente se expande hacia un volumen mayor al salir del orificio y, segundo, a través de la hoja de metal que vibra por acción del material que fluye sobre ella. El flujo se ajusta para obtener frecuencias ultrasónicas (Figura 11) (Arzeni, 2014).

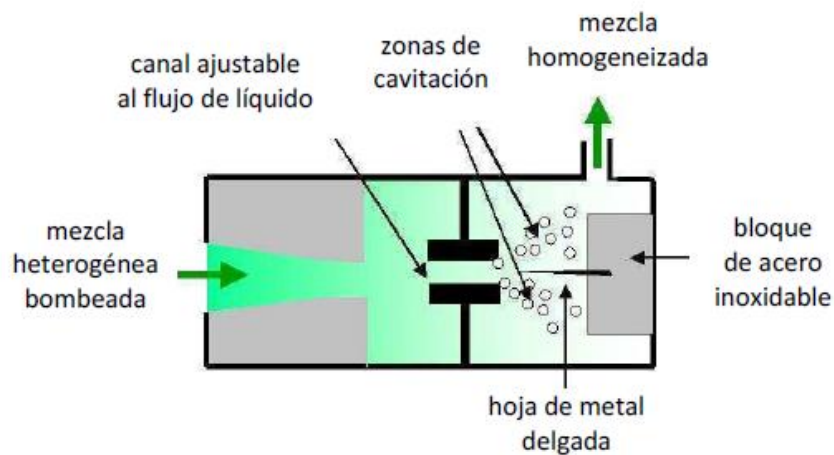


Figura 11. Homogeneizador ultrasónico

Transductor piezoeléctrico ultrasónico o ultrasonicador de sonda

Un transductor piezoeléctrico es un dispositivo capaz de transformar energía eléctrica en energía mecánica. A través de un campo eléctrico se produce una deformación mecánica en el material piezoeléctrico y, si el campo eléctrico varía rápidamente, se producen ondas de frecuencia ultrasónica, que se transmiten al medio utilizando una sonda sumergida en el mismo (Figura 12) (Arzeni, 2014).



Figura 12. Transductor piezoeléctrico ultrasónico

1.9.3. Reacciones químicas

El colapso de microburbujas ocurre en un corto tiempo y consecuentemente se genera calor adiabático arriba de 5000 K en las burbujas. En un medio acuoso, las moléculas gaseosas (principalmente vapor de agua) son difundidas dentro de las microburbujas durante el crecimiento de la burbuja en el proceso de US. Cuando estas moléculas son sometidas a temperatura y presión elevadas se crea el colapso de la burbuja, y ocurren reacciones endotérmicas causando la disociación hemolítica de las moléculas en radicales libres ($\text{OH}\cdot$, $\text{H}\cdot$) (Ashokkumar *et al.*, 2008).

Las reacciones que describen la generación de radicales libres y la formación de nuevos productos se describe a continuación:



El número de radicales libres generados depende de la temperatura de cavitación y el número de microburbujas generadas a una frecuencia y energía específica. A baja frecuencia (20 kHz), el tamaño de una microburbuja puede llegar hasta 100 μm y generar una mayor cantidad de calor en comparación con la generada a una frecuencia más alta (Yasui, 2002). Sin embargo, existe una cantidad más alta de radicales libres en intervalos de frecuencia alta (200-500 kHz) debido a que se generan más microburbujas a frecuencias altas que a frecuencias bajas (Ashokkumar *et al.*, 2008).

Las reacciones que ocurren a través de radicales libres producidos por el US pueden tomar lugar en tres diferentes regiones (Adewuyi, 2001):

- Dentro de la burbuja que implota debido a las altas presiones y temperaturas alcanzadas; en esa región es importante considerar la volatilidad de los compuestos involucrados en la reacción.
- En la interfase entre la burbuja y el volumen de líquido donde existen gradientes de temperatura y presión; aquí los efectos dependen de la hidrofobicidad de los compuestos involucrados, lo cual permite una mayor concentración de las moléculas en esta área.
- En el volumen de líquido donde los radicales libres que no han reaccionado en la región interfacial lo hagan con los compuestos disueltos en el líquido.

1.9.4. Aplicaciones de ultrasonido de alta intensidad en concentrados proteicos

Recientemente se ha profundizado acerca de los cambios de las propiedades funcionales (como las espumantes, emulsificantes y gelificantes) en dispersiones de WPC al 5 y 10% (p/v) mediante el US de alta intensidad a diferentes amplitudes. Los estudios demuestran que el US ayuda a formar rápidamente espumas, las cuales resultan ser más estables debido a la homogeneización por efecto del US, el cual generalmente dispersa las partículas de proteína y grasa de manera más uniforme, mejorando a su vez la capacidad de formar espumas. Agregan que además de causar una homogeneización en el medio, el US favorece un reordenamiento en las proteínas donde la estructura de proteínas se despliegan por la exposición de dos extremos opuestos cargados de la molécula de proteína, es decir, hidrófobo e hidrófilo, lo cual ayuda a reducir la tensión superficial permitiendo el atrapamiento de aire; además agregan que conforme aumenta la concentración de proteína en las dispersiones decrece la capacidad espumante debido a

que aumenta la viscosidad de la suspensión favoreciendo la resistencia a la cavitación. (Jambrak *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2015).

En un estudio análogo (Krešić *et al.*, 2008) utilizando una suspensión de 10% (p/p) se encontró que existe un aumento de viscosidad en las suspensiones de WPC con respecto al tiempo de sonicación, debido a que se forman agregados de alto peso molecular lo cual incrementa la resistencia e impide la propagación de las ondas ultrasónicas en el medio. Sin embargo, en suspensiones de WPC que se someten a tratamientos cortos se obtienen viscosidades bajas.

Chandrapala *et al.* (2011) reportaron cambios en propiedades gelificantes con WPC a concentraciones del 5 y 10% (p/v), atribuyéndolo a la desnaturalización de proteínas, lo cual promueve la formación de nuevos enlaces disulfuro dando pie a la formación de agregados proteicos.

2. Metodología

En la Figura 13 se muestra el diagrama general del trabajo realizado en este proyecto de tesis, los cuales se describen a continuación:

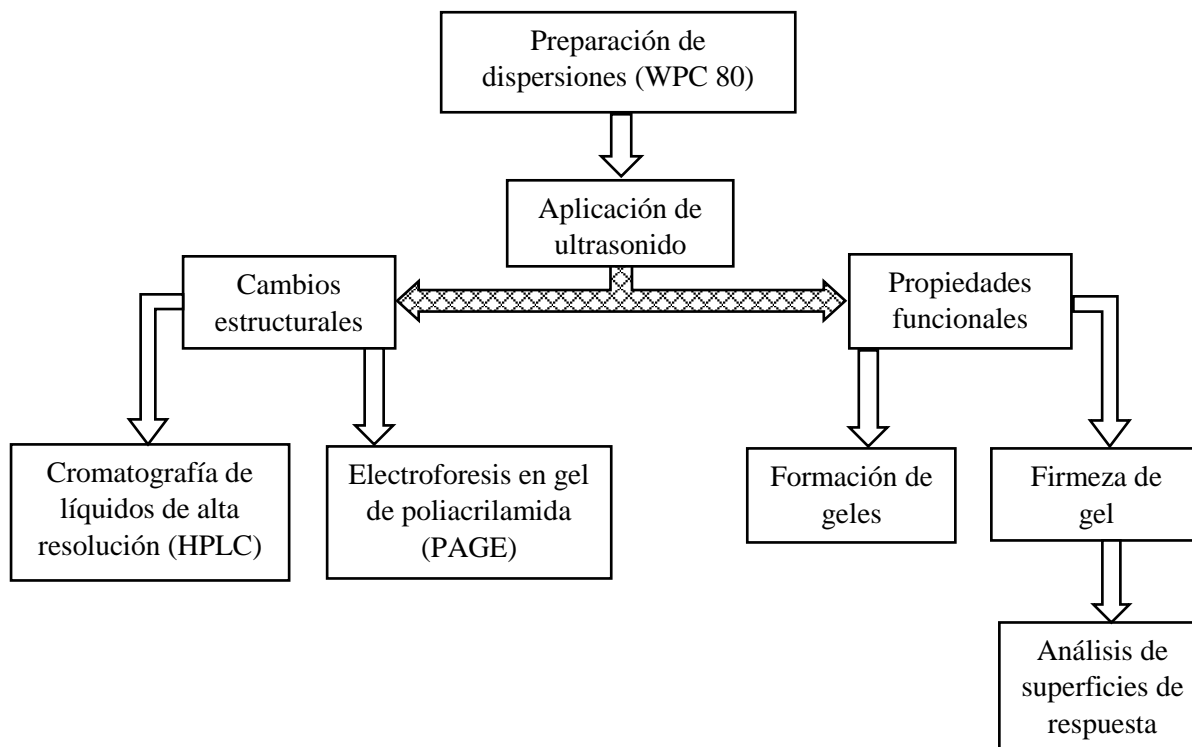


Figura 13. Diagrama general de trabajo.

2.1. Preparación de la muestra

Se realizaron dispersiones coloidales de concentrado de suero de leche (WPC 80) de la marca Lacprodan 80, el contenido nutricional del concentrado se encuentra en la Tabla 5 (Arla Foods Ingredients, México) (Figura 14). Las concentraciones empleadas fueron de 15 y 20% (p/v). Para preparar 300 mL de dispersión se pesaron 45 y 60 g respectivamente; posteriormente se mezclaron con ayuda de un agitador de vidrio durante 20 min. Las dispersiones se dejaron reposar 30 min para su estabilización.

Tabla 5. Información nutricional de Lacprodan 80	
Cantidades por 100 g de muestra	
Energía	408 kcal
Proteína	76 g
Carbohidratos	9 g
- Azúcares	9 g
Grasas	10 g
- Saturadas	6.4 g
- Trans	0.3 g
Fibra	0 g
Sodio	0.2 g
Colesterol	37 mg

Fuente: Arla Foods



Figura 14. Lacprodan 80

2.2. Ultrasonido

Las dispersiones coloidales se sometieron a los diferentes tratamientos de US mostrados en la Tabla 6. El US se aplicó utilizando un procesador de sonda Hielscher UP400S (Teltow, Alemania) que opera a una frecuencia fija de 24 kHz, con una potencia de salida de 400 W aplicada a través de un sonotrodo de 22 mm de diámetro (Figura 15). Se utilizó una amplitud de 100% en todos los tratamientos; el sonotrodo fue introducido 2.5 cm en la matriz proteica, empleando un baño de recirculación para controlar la temperatura del proceso.

Para conocer la potencia real aplicada a la matriz alimenticia, se realizó un estudio calorimétrico con respecto a las concentraciones de proteína, mediante un método adaptado de Torkamani *et al.*, (2014). Se colocaron 300 mL de la dispersión coloidal (25°C) sumergiendo el sonotrodo 2.5 cm en la dispersión; se realizó el tratamiento ultrasónico durante 3 min sin control de temperatura a una amplitud del 100%. El aumento inicial de temperatura (dT/dt) se determinó de la pendiente de los datos de temperatura

registrados contra el tiempo para cada tratamiento. La potencia efectiva para cada tratamiento fue calculada a partir de la siguiente ecuación:

$$P_n = m_n c_p \left(\frac{dT}{dt} \right) \quad (\text{Ec. 1})$$

Dónde:

P_n es la potencia efectiva (W) determinada para el tratamiento n

m_n es la masa (kg) sometida al tratamiento n

c_p es el calor específico (J/kg °C) para la muestra n

El calor específico para cada muestra se calculó a partir de la composición de WPC 80 indicado en la ficha técnica correspondiente, utilizando la ecuación de Choi y Okos (Singh y Heldman, 2001):

$$c_p = \sum_{i=1}^n c_{pi} X_i \quad (\text{Ec. 2})$$

Dónde:

c_{pi} es el calor específico para el componente i

X_i es la fracción peso del componente i

Los calores específicos por componente de leche se determinaron con las siguientes fórmulas (Singh y Heldman, 2001) utilizando la temperatura promedio (T) registrada en cada tratamiento:

Proteína $c_p = 2.0082 + 1.2089 \times 10^{-3}T - 1.3129 \times 10^{-6}T^2$

Grasa $c_p = 1.9842 + 1.4733 \times 10^{-3}T - 4.8008 \times 10^{-6}T^2$

Lactosa $c_p = 1.5488 + 1.9625 \times 10^{-3}T - 5.9399 \times 10^{-6}T^2$

Cenizas $c_p = 1.0926 + 1.8896 \times 10^{-3}T - 3.6817 \times 10^{-6}T^2$

Agua $c_p = 4.1762 - 9.0864 \times 10^{-5}T + 5.4731 \times 10^{-6}T^2$

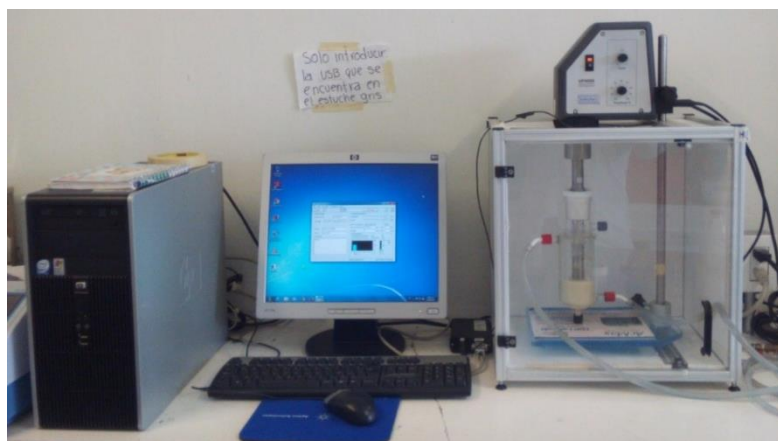


Figura 15. Equipo de ultrasonido Hielscher UP400S

Tabla 6. Tratamientos de ultrasonido a los tiempos y temperaturas seleccionados.

Tratamiento	Tiempo de sonicación (min)	Temperatura (°C)
1	7	50
2	10	50
3	14	50
4	17	50
5	21	50
6	7	60
7	10	60
8	14	60
9	17	60
10	21	60

2.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

El análisis de HPLC se realizó empleando el método estándar del International Dairy Federation (IDF) (ISO y IDF, 2005). Se ocuparon dos fases móviles: una (A) conformada por 0.1% de TFA y 99.9% agua HPLC; la otra (B) por 0.1% TFA y 99.9% acetonitrilo. Las muestras se prepararon mezclando 0.20 mL de la dispersión coloidal de WPC, 2.4 mL de urea 6 M y 2.4 mL de una solución de agua, acetonitrilo y TFA en proporción de 90:10:0.1, respectivamente. Posteriormente, se tomaron 2 mL de muestra, lo cuales se filtraron (Whatmann, 0.45µm) previo a la inyección (50 µL) en una columna 300SB-C18 (150 x 4.6 mm) con un diámetro de partícula de 50 µm y un ancho de poro de 300 Å. La

columna se operó isotérmicamente a 40°C. Se utilizó un cromatógrafo Infinity 1260 (Agilent, Alemania), provisto de un inyector automático, sistema de bomba cuaternario y un detector de arreglo de diodos (Figura 16).

La fase móvil se alimentó a razón de 0.5 ml/min; las proteínas se analizaron usando un detector UV a 220 nm. El gradiente de elución se muestra en la Tabla 7. La concentración de β -LG (ppm) se obtuvo utilizando una curva patrón de β -LG en el intervalo de 250-5000 ppm.

Tiempo (min)	Solvente A	Solvente B
0.0	65	35
1.0	65	35
8.0	62	38
16.0	58	42
22.0	54	46
22.5	0	100
23.0	0	100
23.5	65	35
33.0	65	35

Fuente: ISO y IDF, (2005)



Figura 16. Cromatógrafo Agilent Infinity 1260

2.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

Las pruebas de PAGE se realizaron en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Tlaxcala empleando una unidad mini de electroforesis de gel de losa (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EE.UU.) (Figura 17) de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). Para preparar el gel de resolución se agregaron 3 mL de agua desionizada, 2.5 mL de buffer Tris 1.5 M pH 8.8, 4.3 mL acrilamida, 35 μ L persulfato de amonio al 10% y 5 μ L de TEMED, teniendo cuidado en agregar el persulfato y TEMED al final ya que son los agentes que inician la polimerización del gel. Para el gel de apilamiento se agregaron 6.2 mL de agua desionizada, 2.5 mL de buffer Tris 0.5 M pH 6.8, 1 mL acrilamida, 100 μ L persulfato de amonio al 10% y 5 μ L de TEMED. Una vez colocados los geles, se posicionaron los peines sobre el gel de apilamiento. Las muestras se dispersaron en buffer Tris 0.5 M pH 6.6 que contiene 0.05% β -mercaptoetanol y 0.01% de azul de bromofenol. Posteriormente se diluyen 1:10 y se toman 10 μ L de muestra. Los geles se corrieron aplicando una corriente de 210 V en una solución tanque durante 1 h y empleando azul de Comasio para la tinción, el cual se mezcla en 25% (v/v) de isopropanol y 10% (v/v) de ácido acético y se deja en agitación constante durante 1 h. Posteriormente, los geles se destiñieron con una solución que contiene 10% de isopropanol y 10% de ácido acético durante un periodo total de 24 h.

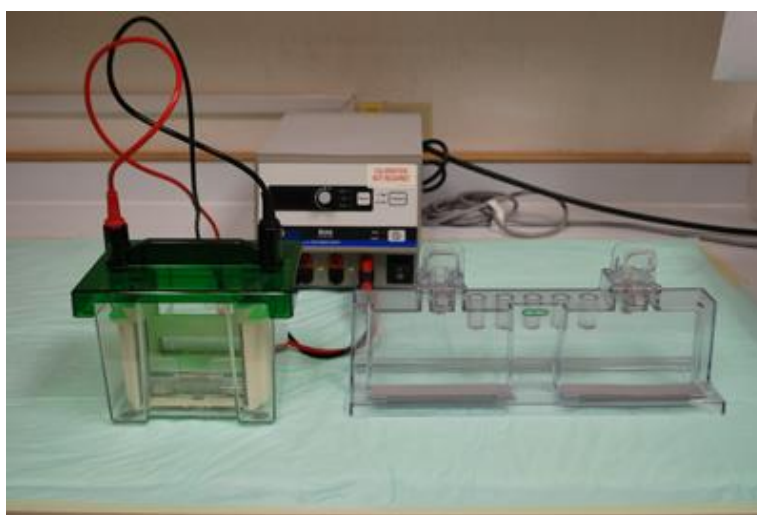


Figura 17. Unidad de electroforesis Mini-Bio Rad

2.5. Formación de gel inducida por calor

Para la prueba de formación de gel inducida por calor, se utilizó la metodología descrita por Chandrapala *et al.* (2011). Se colocaron 55 g de dispersiones coloidales de WPC en frascos; posteriormente se calentaron las muestras en un baño de agua a 80°C por períodos adicionales de tiempo de hasta 20 min, seguido de un enfriamiento inmediato. Después se dejaron en refrigeración durante 15 h para posteriormente hacer el análisis de firmeza de gel.

2.6. Firmeza de gel

Para realizar firmeza de gel, se utilizó un texturómetro Texture Technologies, TAXT-Plus (Surrey, Reino Unido) con celda de carga de 30 kg de capacidad (Mizuno y Lucey, 2007). Se realizó una prueba de compresión mediante la inserción de una sonda cilíndrica de 0.5 cm de diámetro a una velocidad de 1 mm/s con una distancia de compresión de 10 mm a la muestra (4°C). El análisis se realizó por triplicado y se registró la fuerza máxima (Figura 18).



Figura 18. Texturómetro Texture Technologies TAXT-Plus

2.7. Análisis estadístico de datos

Los datos se ajustaron a un modelo polinómico cuadrático de regresión en el programa Excel para ver la influencia del tiempo de sonicación, concentración proteica y temperatura (Ec. 3) sobre la firmeza del gel (FG), la cual fue la variable de respuesta a analizar mediante superficies de respuesta considerando los valores presentados en la Tabla 8.

$$Iny = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 + b_{22}x_2^2$$

(Ec. 3)

Donde x_1 : Temperatura, x_2 : Tiempo; x_3 : concentración de WPC (p/v)

La significancia de los términos se evaluó mediante el coeficiente cuadrático de regresión (R^2).

Tabla 8. Niveles de cada variable a considerar para superficies de respuesta de FG

x_1	x_2	x_3	x_2^2
-1	-1.0000	1.0000	1.0000
-1	-0.5714	1.0000	0.3265
-1	0.0000	1.0000	0.0000
-1	0.4286	1.0000	0.1837
-1	1.0000	1.0000	1.0000
1	-1.0000	1.0000	1.0000
1	-0.5714	1.0000	0.3265
1	0.0000	1.0000	0.0000
1	0.4286	1.0000	0.1837
1	1.0000	1.0000	1.0000
-1	-1.0000	-1.0000	1.0000
-1	-0.5714	-1.0000	0.3265
-1	0.0000	-1.0000	0.0000
-1	0.4286	-1.0000	0.1837
-1	1.0000	-1.0000	1.0000
1	-1.0000	-1.0000	1.0000
1	-0.5714	-1.0000	0.3265
1	0.0000	-1.0000	0.0000
1	0.4286	-1.0000	0.1837
1	1.0000	-1.0000	1.0000

x_1 : Temperatura de sonicación (-1 nivel bajo 50°C, 1 nivel alto 60°C); x_2 : tiempo de sonicación (se ocupa la fórmula (nivel a analizar-14 min)/7 min); x_3 : concentración de dispersiones (-1 nivel bajo 15%, 1 nivel alto 20%); x_2^2 : tiempo de sonicación elevado al cuadrado por tener más de dos niveles.

3. Resultados y Discusión

3.1. Preparación de la muestra

En la Figura 19 se muestra la preparación de las dispersiones coloidales de proteína; cabe mencionar que las muestras se dejaron reposar 30 min después de ser dispersas ya que es necesaria la hidratación completa de la proteína (Chandrapala *et al.*, 2011). Conforme aumenta la concentración de proteína se incrementa la complicación para disolverla; sólo se empleó un agitador de vidrio para dispersar para evitar la formación de abundante de espuma. Las muestras fueron precalentadas a 52 y 62°C respectivamente previo al proceso de US.



Figura 19. Preparación de dispersión coloidal de WPC 80 a 15% (p/v)

3.2. Ultrasonificación de potencia

En la Figura 20 se muestra el proceso de US de las dispersiones coloidales preparadas; cabe mencionar que para tiempos arriba de 3 min es necesario ocupar un baño de recirculación de agua, ya que la temperatura de la dispersión se eleva rápidamente provocando la desnaturalización de las proteínas y posteriormente la gelificación en el mismo equipo, por lo cual el proceso se podía interrumpir abruptamente. La temperatura de recirculación que se empleó para mantener la temperatura de las dispersiones fue de 20 y 15°C para los procesos de US a 50 y 60°C respectivamente.

Se realizó un seguimiento calorimétrico a las dispersiones de 15 y 20% (p/v) durante 3 min ya que después de ese tiempo se llegaba a la temperatura de desnaturalización (70°C) formando un gel, el cual no permitía continuar con el proceso. La potencia real obtenida para las dispersiones de 15 y 20% (p/v) fueron de 88.5044 y 89.4525 W respectivamente (en el Anexo 1 se muestra los cálculos realizados para obtener la potencia real efectiva), mostrando una diferencia aproximada de 1 W entre las concentraciones. Krešić *et al.* (2008) y Jambrak *et al.* (2008) ocuparon un US de potencia de la marca Sonics & Materials Inc., el cual tiene una potencia de salida de 600 W y una frecuencia fija de 20 kHz; obtuvieron potencias efectivas en el rango de 43-48 W trabajando a 60% de amplitud. Por otro lado, Chandrapala *et al.* (2011) ocuparon un US de potencia de la marca Branson el cual tiene una potencia de salida de 450 W y una frecuencia fija de 20 kHz con el que obtuvieron una potencia efectiva de 31 W trabajando a una amplitud de 50%. Comparando estos resultados se observa que se tiene un mayor porcentaje de potencia efectiva en el US que se utilizó (21%), ya que los porcentajes de potencia efectiva de los autores antes mencionados son de 13 y 15%, respectivamente.



Figura 20. Ultrasonido de dispersiones coloidales de WPC

3.3. Concentración proteica por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Los resultados obtenidos del porcentaje de proteína desnaturizada (β LG-A y β LG-B) de las dispersiones coloidales tratadas por US se muestran en la Figura 21 (Anexo 2), donde se observa un aumento en el porcentaje de desnaturización de proteína nativa (β -LG) entre los tratamientos de US con respecto al control. El incremento en el porcentaje de desnaturización se debe a que al dejar grupos tioles libres se promueven las interacciones proteína-proteína lo cual ayuda a formar agregados y como consecuencia disminuye el contenido de proteína nativa (Dissanayake, 2011).

Además, se observa que en concentraciones de 20% (p/v) al llegar a tiempos de sonicación largos disminuye el porcentaje de desnaturización de proteína nativa comparado con tratamientos a tiempos menores (<14 min). Esto se debe que el tratamiento de US a tiempos largos no logra romper los enlaces de los agregados formados a tiempos de sonicación más cortos promoviendo la re-agregación, formando agregados de alto peso molecular; debido a esto hay un incremento en la viscosidad de la dispersión impidiendo que las ondas ultrasónicas sigan rompiendo enlaces de baja energía. Sin embargo, en tiempos cortos (<14 min) logra un efecto inverso, demostrando así que la viscosidad de las dispersiones aumenta conforme transcurre el tiempo de sonicación (Krešić *et al.*, 2008). Phillips y Williams (1995) sugieren que el aumento en la viscosidad se debe a la alteración de la estructura terciaria de las proteínas, en donde las partes hidrófilas de los aminoácidos son expuestas hacia el entorno de agua, lo cual conduce a una mayor unión de moléculas de agua, concluyendo que al aumentar la capacidad de retención de agua se aumenta la viscosidad de la dispersión ya que son propiedades funcionales que se relacionan entre sí. Ashokkumar (2011) agrega que el calentamiento de las proteínas globulares interrumpe algunas de las fuerzas responsables de la estabilidad de las estructuras secundarias y/o terciarias. Estas fuerzas incluyen interacciones de puentes de hidrógeno entre grupos polares e interacciones de los grupos no polares (interacciones hidrofóbicas) a través de las moléculas de agua circundantes que forman jaulas alrededor de los grupos hidrofobos. Enlaces electrostáticos y fuerzas de Van der Waals también están envueltos en este proceso de desnaturización térmica, aunque en menor medida. Sin embargo, en tratamientos térmicos prolongados, el proceso es reversible, aumentando la agregación de proteínas. La sonicación también puede dar lugar a la interrupción de las fuerzas intramoleculares de las proteínas, debido a fuerzas

de cizallamiento, y dar lugar a la formación de agregados en sonicación prolongada como en el caso del tratamiento térmico.

Sin embargo, a concentración de 15% a una temperatura de 60°C se logra observar cómo el efecto de la desnaturalización es muy similar al de la concentración de 20% a la misma temperatura, solo en el caso de la β LG-B, comprobando que al tener una mayor concentración proteica se promueven las interacciones proteína-proteína formando dispersiones más viscosas; es por ello que el efecto del US en la concentración de 20% es muy similar a la concentración de 15%, además de que la desnaturalización de β -LG tiene una mayor influencia por la temperatura, por eso este comportamiento se da a los 60°C.

El efecto de la temperatura en el proceso de US tiene diferencia significativa, ya que a 60°C se tiene una mayor desnaturalización comparado con el control (alrededor del 26% de proteína desnaturalizada), de acuerdo a los resultados de porcentaje de desnaturalización de proteína nativa (β -LG). Esto se debe a que el proceso de desnaturalización ocurre a 70°C, donde al utilizar una temperatura cercana a ésta en el proceso de US, se obtiene un efecto sinérgico, por lo cual podemos obtener proteínas desnaturalizadas sin tener que llegar a la temperatura de desnaturalización. Frydenberg *et al.* (2016) mencionan que la combinación del US con temperatura tiene un efecto sobre el comportamiento térmico de las proteínas. Ellos sugieren que esta combinación causa un despliegue de las proteínas por lo cual los enlaces intramoleculares son más propensos a sufrir ruptura por el proceso de US, causando la desnaturalización proteica y por consiguiente provocando la agregación de proteínas.

De acuerdo al análisis de datos utilizado ($R^2 = 0.9418$) (Figura 22), se obtuvo diferencia significativa entre las variables de concentración de la muestra, temperatura y tiempo de sonicación (Anexo 3); sin embargo, las interacciones entre las mismas no mostraron diferencias significativas, es decir que la combinación de temperatura-concentración, tiempo-concentración y tiempo-temperatura no tienen una fuerte influencia como lo tienen la temperatura por sí sola, el tiempo y la concentración.

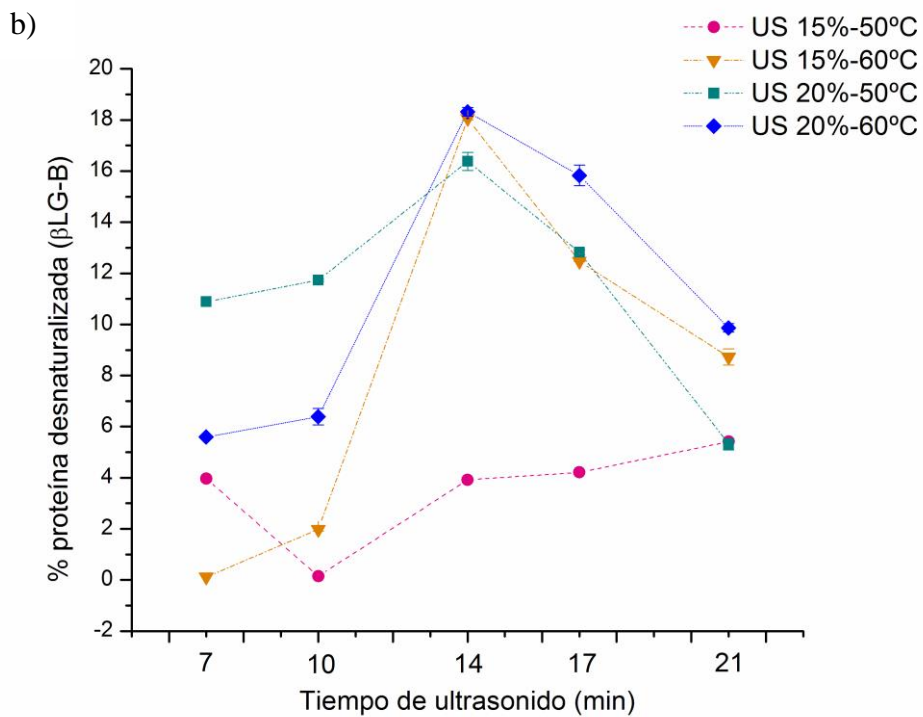
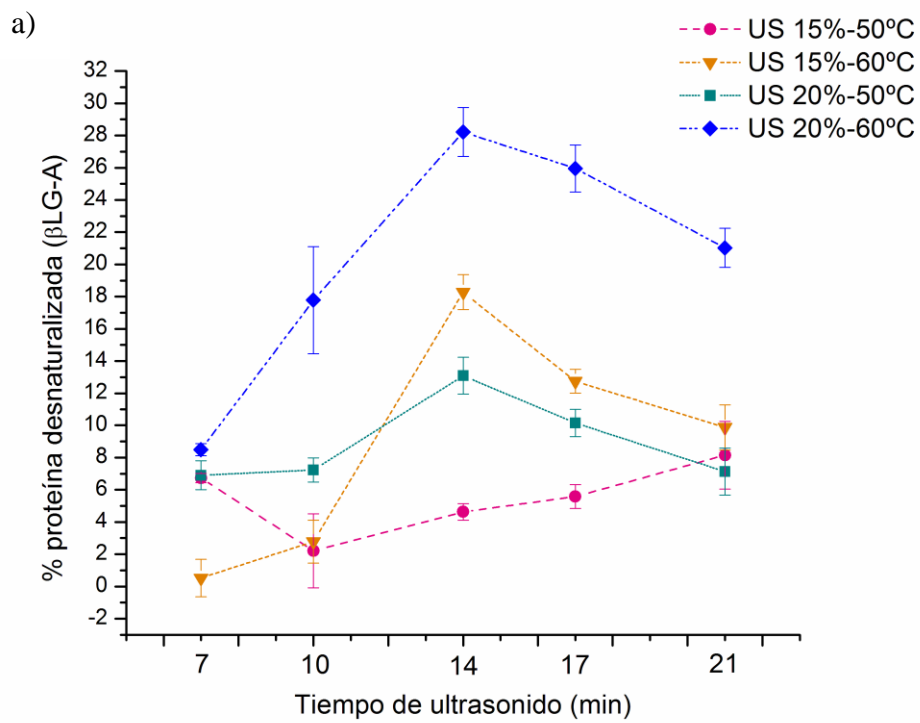


Figura 21. Porcentaje de desnaturación de β LG-A (a) y de β LG-B (b) en dispersiones coloidales tratadas por US a tiempos y temperaturas selectos

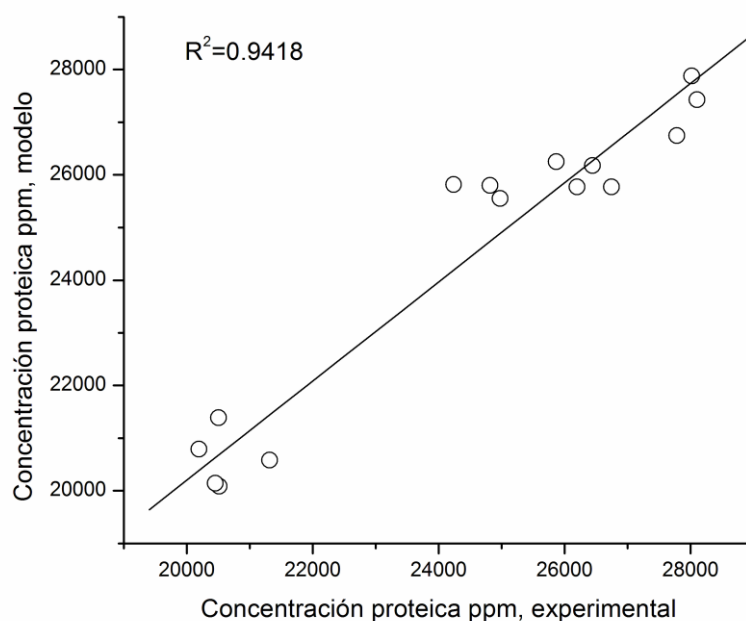


Figura 22. Regresión cuadrática de β -LG (ppm)

3.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

Para poder analizar los resultados de PAGE nativo se utilizó el software GelAnalyzer2010a, el cual obtiene la intensidad de las bandas de cada tratamiento las cuales se representan en forma de picos y se presentan en forma de densitogramas.

Las bandas de cada tratamiento para analizarlos en forma de densitogramas se representan de la siguiente forma: la banda 1 representa la proteína que se quedó retenida en el proceso debido a que su peso molecular es alto, la banda 2 representa a α -LA, finalmente las bandas 3 y 4 representan a β LG-B y β LG-A, respectivamente (Havea, B., Lawrence, K. y Campanella, C., 1998).

Los densitogramas de cada tratamiento se muestran en las Figura 23 y 24, donde se observa que las tonalidades de las bandas son similares en todos los tratamientos, destacando que sí hay un cambio en comparación con el control de cada concentración de proteína. Jambrak *et al.* (2014) analizaron mediante SDS-PAGE dispersiones coloidales de 10% (p/v) de WPC y WPI con diferentes tratamientos ultrasónicos (US de potencia de 20 kHz y US de baño de 40 kHz) mencionando que hay cambios en el peso molecular de las proteínas, principalmente en β -LG y α -LA. Además, agregan que el tiempo de sonicación no favorece la formación de agregados ya que no logra romper todos los enlaces de baja energía, mientras que en tiempos cortos hay una mayor ruptura de

éstos. Esto se logra ver en los resultados obtenidos, ya que en tiempos de sonicación cortos (7, 10 y 14 min) se observan bandas más claras.

Para poder realizar un análisis más preciso a través de la intensidad de las bandas de cada tratamiento, se realizó una gráfica de porcentaje de desnaturalización de α -LA y β -LG (Figura 25), empleando la siguiente fórmula para cada proteína:

$$\% \text{ proteína desnaturalizada} = 100 - \left(\frac{\text{intensidad muestra tratada}}{\text{intensidad control}} * 100 \right) \quad (\text{Ec. 4})$$

Se observa el mismo patrón en los valores obtenidos a través de HPLC, donde a tiempos largos el porcentaje de desnaturalización decrece, comprobando que tratamientos de US mayores a 14 min no se logra una desnaturalización completa de las proteínas. La mayor desnaturalización al igual que en análisis anterior, se logra en los tratamientos con mayor concentración y mayor temperatura (20%, 60°C) en el tiempo de 14 min. Sin embargo, Chandrapala *et al.* (2011), al realizar un PAGE nativo mencionan que los pesos moleculares de las proteínas no se redujeron por US; además, indican que al realizar el análisis de HPLC en fase inversa después del tratamiento con urea fue incapaz de detectar cualquier cambio en la composición de proteínas subyacentes por el tratamiento con ultrasonidos para WPI o WPC. Los resultados que obtuvieron sugieren que la aplicación del proceso de US a dispersiones de proteína de suero con una frecuencia de 20 kHz y una potencia de 50 W causa modificaciones físicas predominantemente a nivel macro y las proteínas nativas se mantiene sin cambios. Sin embargo, estos autores realizaron el proceso de US a 6°C, además de que los cambios físicos presentados son menores, lo cual indica que para encontrar cambios estructurales en las proteínas nativas y cambios físicos de alto impacto se requiere un proceso de termosonicación, el cual con ayuda de la temperatura logra cambios estructurales en las proteínas.

Comparando la magnitud de desnaturalización de α -LA y β -LG, se observa que ésta es mayor para α -LA, lo cual de primera instancia puede resultar sorprendente; sin embargo, Chandrapala *et al.* (2012) mencionan que aunque α -LA es más estable al calor, el US puede causar cambios estructurales debido a que ocurre el colapso de las burbujas de gas produciendo ondas de choque de alta intensidad, microjets, fuerzas de cizallamiento y turbulencia; además añade que β -LG sufre cambios estructurales menores ya que contiene una gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos dentro de la molécula y es una proteína termolábil, por lo cual, para lograr desestabilizarla rápidamente se

requiere de un proceso de calentamiento directo. Sin embargo, el US logra causar cambios estructurales sin tener que dañar tanto a la proteína, como en un proceso de calentamiento directo.

Frydenberg *et al.* (2016) mencionan que los efectos del US son dependientes de la proporción de α -LA y β -LG, donde una mayor proporción de α -LA hace más susceptible a las dispersiones de WP al proceso de US. Además la relación también es importante para las interacciones inter e intramoleculares formadas después del proceso de US gracias al despliegue de las proteínas, donde grandes cantidades de α -LA están asociadas con un mayor grado de enlaces disulfuro. Agregan que la estructura secundaria de α -LA y β -LG difieren en gran medida, donde α -LA consiste primordialmente de α -hélices y β -LG de β -hojas. Esto promueve evidencia de lo observado y tiene relación con diferencia en la estructura; β -hojas es considerada una estructura más estable que α -hélices, lo cual explica por qué los concentrados con mayor contenido de β -LG son menos susceptibles a este estudio.

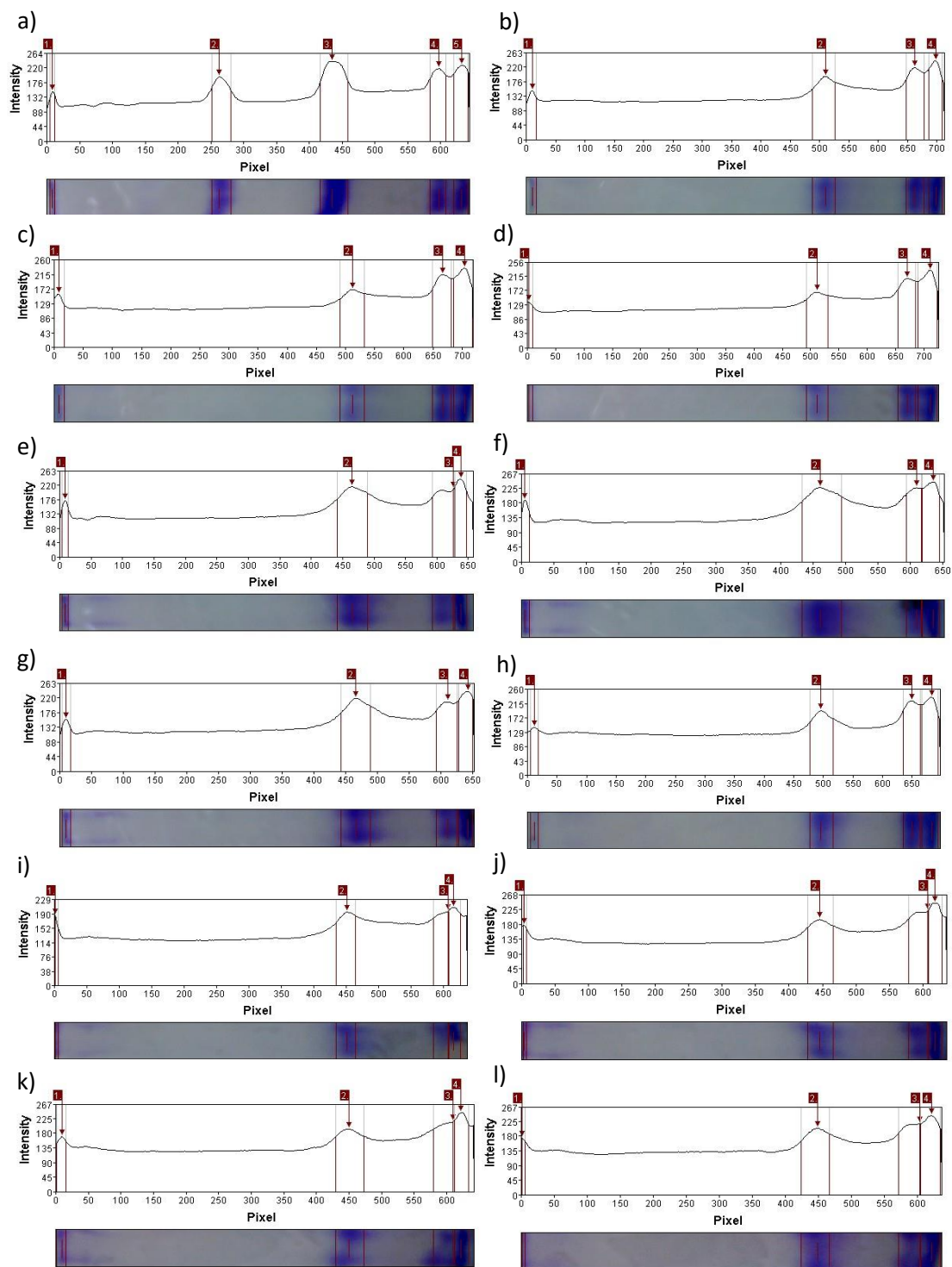


Figura 23. Análisis de bandas de tratamientos de ultrasonido a dispersiones de 15% (p/v). a) Marcador de peso molecular; b) Control 15%; c) US 7 min-50°C; d) US 10 min-50°C; e) US 14 min-50°C; f) US 17 min-50°C; g) US 21 min-50°C; h) US 7 min-60°C; i) US 10 min-60°C; j) US 14 min-60°C; k) US 17 min-60°C y l) US 21 min-60°C.

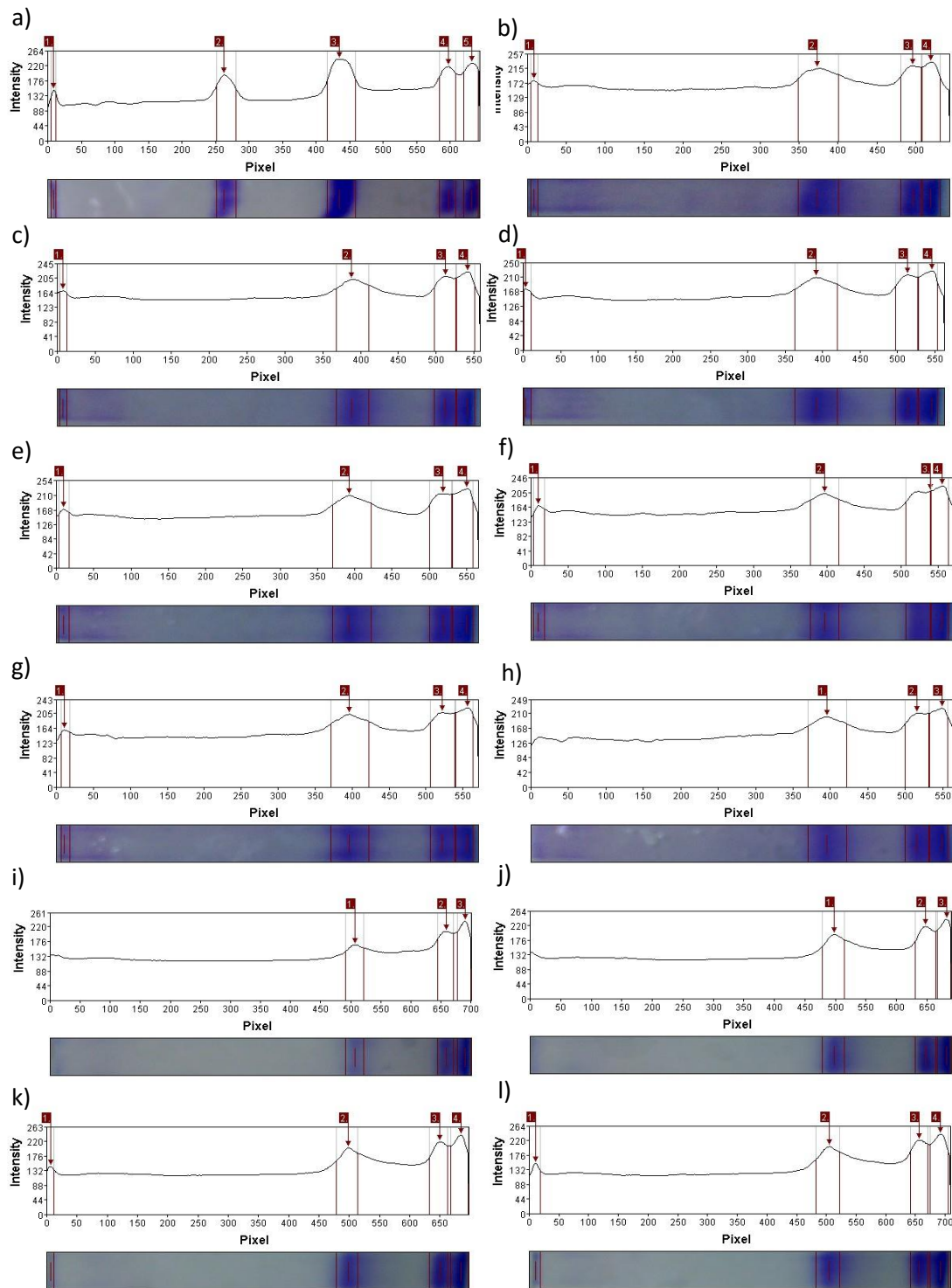


Figura 24. Análisis de bandas de tratamientos de ultrasonido a dispersiones de 20% (p/v). a) Marcador de peso molecular; b) Control 20%; c) US 7 min-50°C; d) US 10 min-50°C; e) US 14 min-50°C; f) US 17 min-50°C; g) US 21 min-50°C; h) US 7 min-60°C; i) US 10 min-60°C; j) US 14 min-60°C; k) US 17 min-60°C y l) US 21 min-60°C.

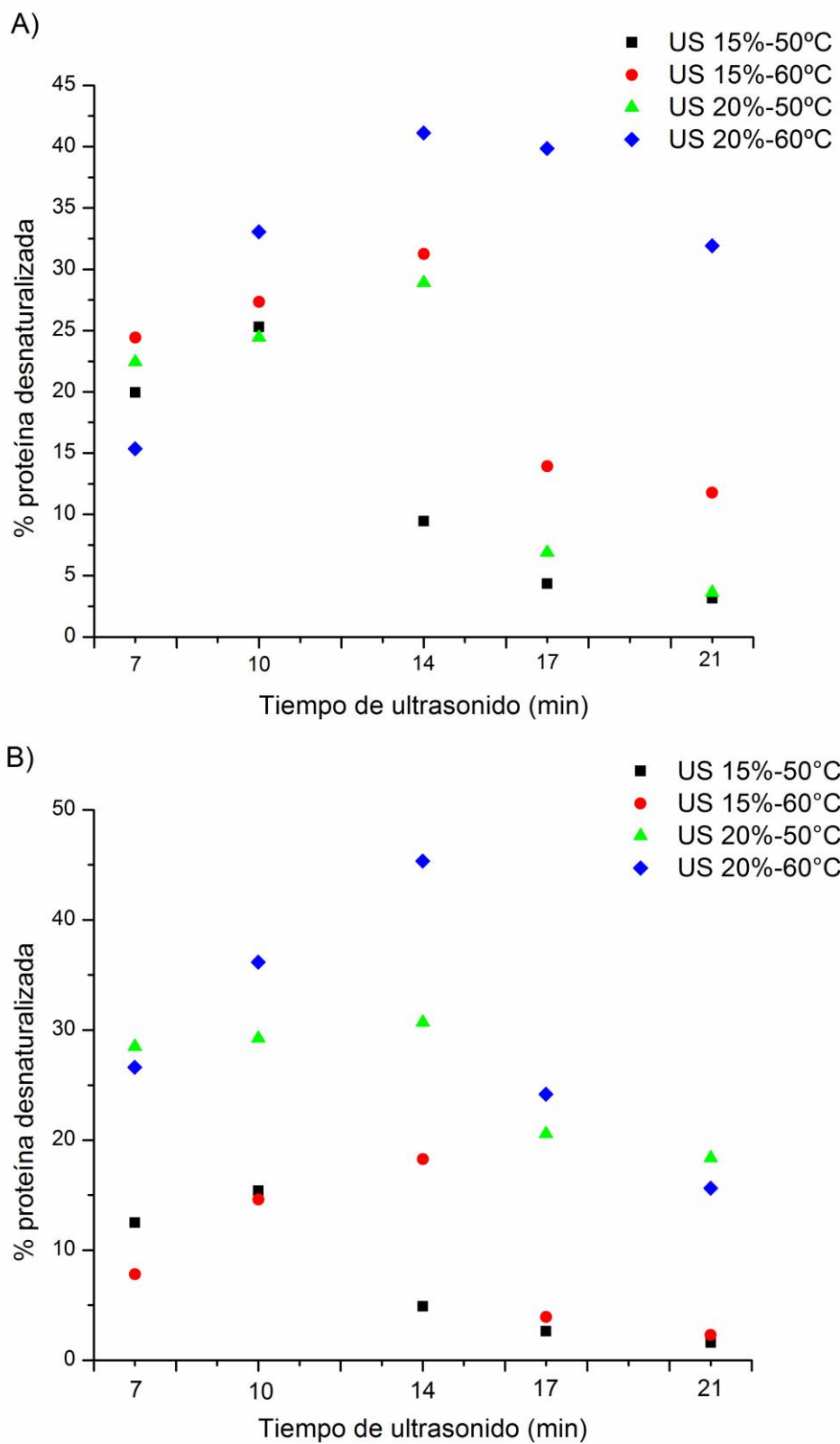


Figura 25. Porcentaje de proteína desnaturalizada de los tratamientos de US; A) α -LA y B) β -LG

3.5. Formación y firmeza de gel

El tiempo de formación de geles de las dispersiones tratadas por US presentó un cambio significativo con respecto al control, ya que en todos los casos se observó que el tiempo promedio de formación se daba a los 16 ± 1 min, mientras que el tiempo de gelificación para los controles excedía de 20 min (Figura 26). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la formación de geles de muestras tratadas por US, ya que todos los geles se formaban entre los 14-16 min (Figura 27). Chandrapala *et al.* (2011) compararon el efecto del pH contra el tiempo de sonicación estudiando, por un lado, dos tiempos de sonicación y dos potencias y, por otro lado, ajustando el pH natural de la muestra a 9.5. A este pH, se observaron tiempo promedio de formación de gel de 15 min, para las muestras tratadas a diferentes potencias y tiempos de sonicación. En contraste, para la muestras a pH básico el tiempo de formación de gel se redujo de 20 a 10 min. En conclusión, el tiempo de formación de gel se ve afectado más por el pH que por el tiempo de sonicación.



Figura 26. Formación de geles de tratamientos de US

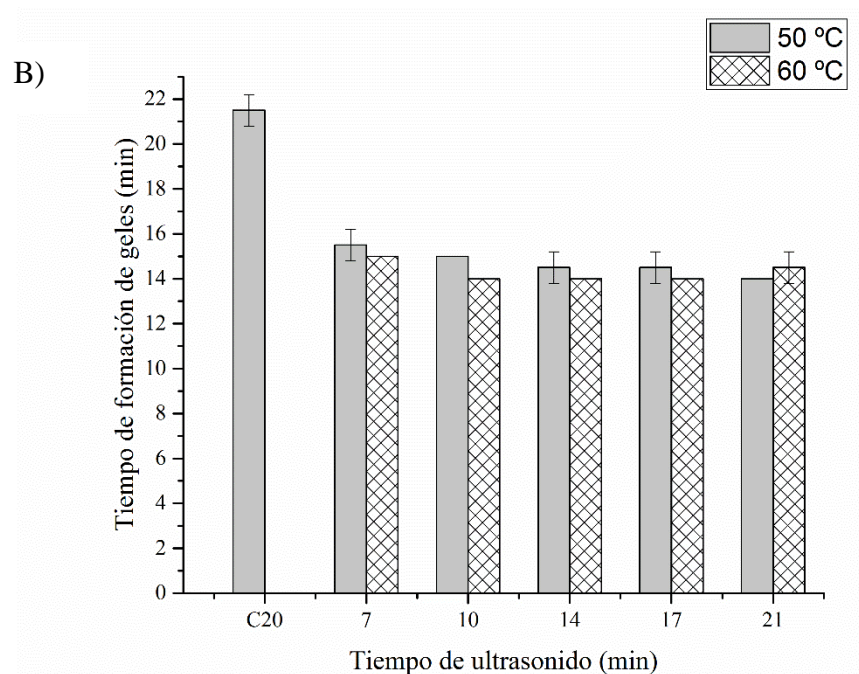
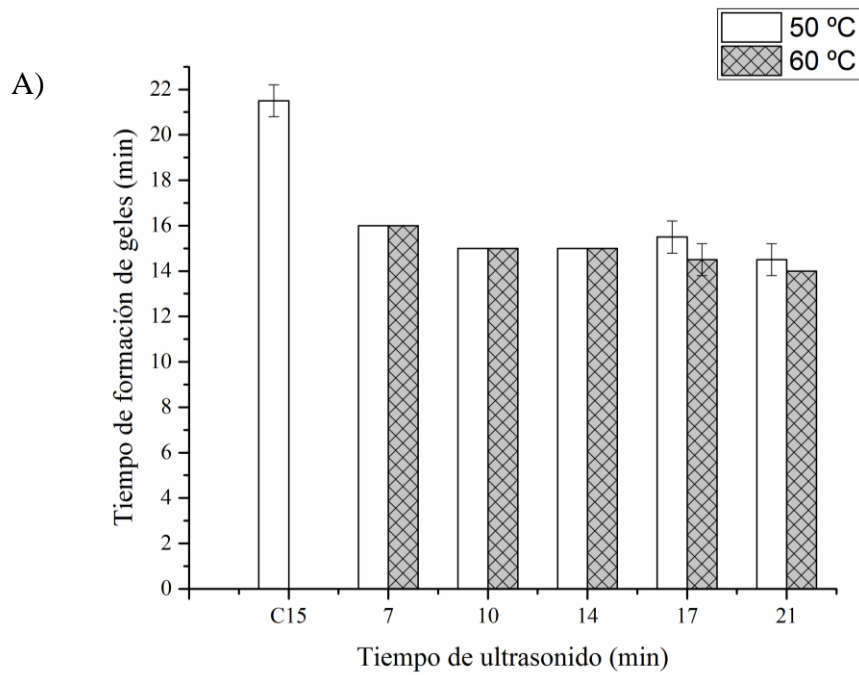


Figura 27. Tiempo de formación de geles de tratamientos de US, A) 15% y B) 20%

En la Figura 28 se muestran los resultados obtenidos de firmeza de gel (FG). Se observó un valor máximo de fuerza a los 17 min con todos los tratamientos con concentraciones de 15% mientras que el valor máximo de fuerza para los tratamientos en muestras con concentración de 20% se observó a los 14 min. Además es claro que tras 21 min hay una disminución de FG en todos los tratamientos; sin embargo, la diferencia sólo es significativa para los tratamientos de 15%-50°C y 20%-60°C. Como ya se había mencionado antes, esto se debe al incremento en la viscosidad de las dispersiones

evitando que el proceso de US cause la ruptura de los enlaces de baja energía, favoreciendo la formación de agregados de alto peso molecular.

En las dos concentraciones utilizadas, los geles de las muestras sonicadas son más firmes que sus respectivos controles. Chandrapala *et al.* (2011) reportan que a concentraciones de 10% (p/v) aplicando un tratamiento de US de 20 min se obtienen geles mucho más firmes que el control y atribuyen esto a la ruptura de los enlaces disulfuro de las proteínas de suero de leche, provocando la desnaturalización proteica y favoreciendo la agregación proteica.

A concentraciones de 20% (p/v), la FG es alta en comparación a la de 15% (p/v), ya que a concentraciones mayores y aplicando el proceso de US se promueve una mayor interacción entre las proteínas ayudando a la formación de nuevos puentes disulfuro entre las cisteínas libres por desnaturalización. Lupano *et al.* (1992) mencionan que la concentración proteica está directamente relacionada con la firmeza de los geles debido a que hay un incremento en la capacidad de retención de agua; además, Weiss *et al.* (2000) comentan que la firmeza de gel incrementa conforme aumenta la amplitud de onda. Por tanto, se puede concluir que al tener una mayor concentración de proteína y con tratamientos a 100% de amplitud se obtienen geles mucho más firmes que con tratamientos de menor intensidad y concentración proteica lo cual se corrobora con los resultados presentados en este trabajo.

De acuerdo al análisis de regresión ($R^2 = 0.89$) el cual se presenta en la Figura 29 (Anexo 3), se observa que la interacción de las variables temperatura y concentración presenta diferencia significativa; esto es claramente visible en la Figura 28, donde cada color en la gráfica representa esta interacción y se muestra la diferencia significativa entre cada interacción concentración-temperatura. A través del modelo implementado (Eq. 3) se obtuvieron superficies de respuesta (Figura 30) para las concentraciones analizadas con los datos obtenidos de FG (Anexo 4), donde se observa que con respecto a la concentración, la mayor magnitud de esta respuesta se obtiene a una concentración de 20% a 14 min de US. Para obtener valores de FG elevados, se necesita una concentración alta y tiempos cortos; lo cual optimiza el proceso minimizando el tiempo de trabajo.

La relación que existe entre la proteína desnaturalizada con FG es notable, ya que al tener menos proteína desnaturalizada también se obtiene una menor FG, como se observa a 21 min de US en 20% (p/v), ya que para lograr una mayor FG, se tiene que

pasar por la etapa de desnaturalización y luego por la de agregación; entre mayor sea la agregación de proteínas, la FG aumenta (Chandrapala *et al.*, 2011).

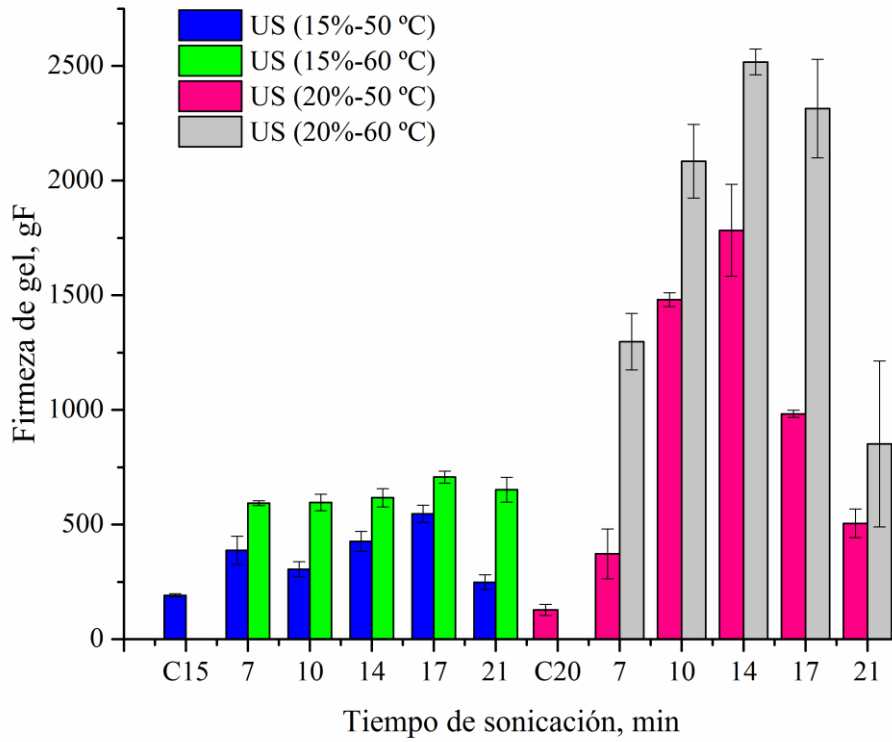


Figura 28. Firmeza de gel de tratamientos de ultrasonido

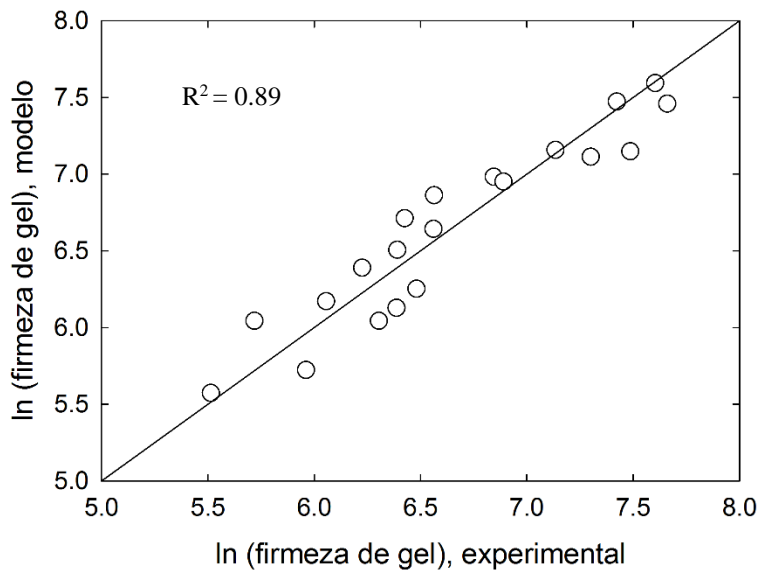
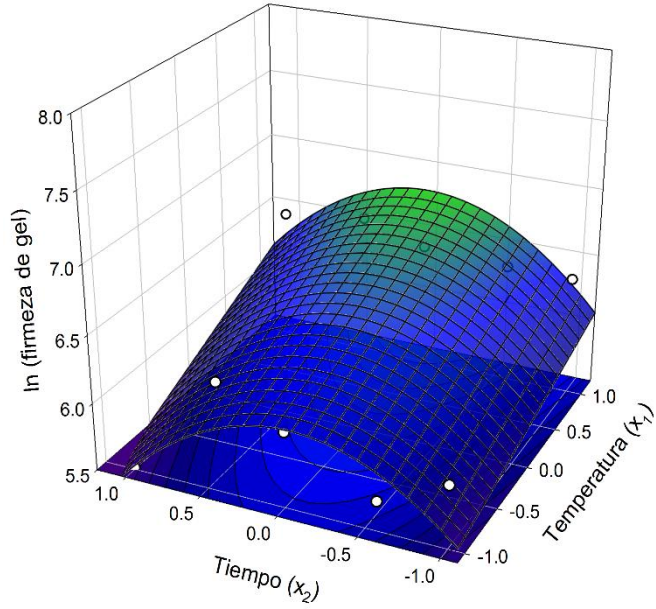


Figura 29. Regresión cuadrática de firmeza de gel

Concentración (x_3) = -1



Concentración (x_3) = 1

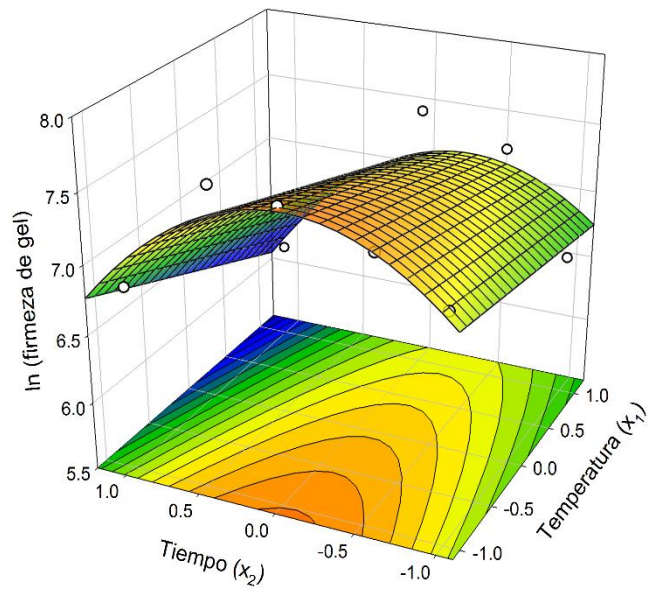


Figura 30. Superficies de respuesta de firmeza de gel, $X_3=1$ (20%) y $X_3=-1$ (15%)

Conclusiones

A partir de los resultados y discusiones presentadas previamente, es posible concluir lo siguiente:

1. La aplicación del US en dispersiones proteicas tiene efecto significativo sobre propiedad de formación de gel, ya que los geles se formaron a tiempos más cortos en comparación con el tratamiento control. Sin embargo, el tiempo de formación de geles no tuvo cambios significativos entre los tratamientos de US.
2. Para las muestras tratadas con US, se obtuvieron geles más firmes para las dispersiones a 20% (p/v) a 60°C y a tiempos intermedios (14 min), condiciones para las cuales se observó un grado de desnaturalización elevado.
3. Los análisis de HPLC y PAGE mostraron que la formación y la firmeza de gel tienen relación con los cambios estructurales de las proteínas. El porcentaje de desnaturalización es mayor a tiempos intermedios (14 min) mientras que en tiempos prolongados disminuye.
4. El grado de desnaturalización de α -LA fue mayor al de β -LG, probablemente debido al proceso de cavitación, mientras que β -LG sufre cambios estructurales menores ya que contiene una gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos.
5. Del análisis de superficies de respuesta de la FG se observa que se optimiza el proceso de US con tiempos cortos (<14 min) y trabajando a temperaturas cercanas a la de desnaturalización (70°C), concluyendo que a tiempos largos se tiene un mayor gasto energético.
6. Finalmente, se comprueba la hipótesis planteada, ya que gracias a la aplicación del US de potencia en dispersiones coloidales de WPC se logra su desnaturalización proteica parcial sin necesidad de llegar a la temperatura de desnaturalización, además de que se promueven cambios en las propiedades funcionales de formación y firmeza de geles.

Trabajo futuro

Aun no se han explorado la separación de los agregados proteicos generados a través del US, por lo cual un área para explorar es la separación de estos a través de un proceso de ultrafiltración, y después obtener polvos de estos agregados y evaluar sus propiedades funcionales.

Por otro lado, se podría evaluar el efecto de la adición de concentrados proteicos tratados con US y transformados a polvo mediante secado por aspersion, sobre las propiedades funcionales y características sensoriales de productos lácteos como helado, queso, yogur.

Finalmente sería interesante hacer un análisis más a fondo acerca de cual factor influye más en la desnaturalización proteica, si el efecto térmico o el efecto ultrasónico, ya que en este trabajo los dos tienen un peso fundamental en los cambios observados, por lo cual no se puede concluir que efecto tiene mayor peso.

Bibliografía

- Adewuyi, Y. G. (2001). Sonochemistry: environmental science and engineering applications. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 40(22): 4681-4715.
- Alting, A. C., Hamer, R. J., de Kruif, C. G. y Visschers, R. W. (2003). Cold-set globular protein gels: interactions, structure and rheology as a function of protein concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(10): 3150-3156.
- Anandharamakrishnan, C., Rielly, C. D. y Stapley, A. (2008). Loss of solubility of α -lactalbumin and β -lactoglobulin during the spray drying of whey proteins. *LWT-Food Science and Technology*. 41(2): 270-277.
- Arzeni, C. (2014). *Modificación molecular y funcional de proteínas de clara de huevo mediante ultrasonidos de alta intensidad: aplicación de esta tecnología al diseño de nanovehículos para ácido fólico* (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Ashokkumar, M. (2011). The characterization of acoustic cavitation bubbles—an overview. *Ultrasonics sonochemistry*. 18(4): 864-872.
- Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilku, K. y Versteeg, C. K. (2008). Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: a preliminary study on a model system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 9(2): 155-160.
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. 4 ed., PEARSON EDUCACIÓN, México.
- Bermúdez-Aguirre, D., Mawson, R. y Barbosa-Cánovas, G. (2008). Microstructure of fat globules in whole milk after thermosonication treatment. *Journal of Food Science*. 73(7): E325-E332.
- Bernal, V. y Jelen, P. (1985). Thermal stability of whey proteins—a calorimetric study. *Journal of Dairy Science*. 68(11): 2847-2852.
- Bouaouina, H., Desrumaux, A., Loisel, C. y Legrand, J. (2006). Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. *International Dairy Journal*. 16(4): 275-284.

- Božanić, R., Barukčić, I. y Lisak, K. (2014). Possibilities of Whey Utilisation. *Austin J. Nutr. Food Sci.* 2(7): 1036-1042.
- Brandenberg, A., Morr, C. y Weller, C. (1992). Gelation of Commercial Whey Protein Concentrates: Effect of Removal of Low-Molecular-Weight Components. *Journal of food science.* 57(2): 427-432.
- Burrington, K. (2012). Technical Report: Whey Protein Heat Stability. U.S. Dairy Export Council, USA.
- Condón, S., Raso, J., Pagán, R., Barbosa-Cánovas, G., Tapia, M. y Cano, M. (2005). Microbial inactivation by ultrasound. *Novel food processing technologies:* 423-442.
- Considine, T., Patel, H., Anema, S., Singh, H. y Creamer, L. (2007). Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments—a review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies.* 8(1): 1-23.
- Coto, A. (2014). *Microparticulación de proteínas a través de concentrados proteicos: WPC 60* (Tesis de Maestría). Universidad de Oviedo, España.
- Chandrapala, J., Zisu, B., Kentish, S. y Ashokkumar, M. (2012). The effects of high-intensity ultrasound on the structural and functional properties of α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin and their mixtures. *Food Research International.* 48(2): 940-943.
- Chandrapala, J., Zisu, B., Palmer, M., Kentish, S. y Ashokkumar, M. (2011). Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. *Ultrasonics Sonochemistry.* 18(5): 951-957.
- Cheftel, J. C. (1995). Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation/Revision: Alta-presion, inactivacion microbiologica y conservacion de alimentos. *Food science and technology international.* 1(2-3): 75-90.
- Chemat, F. y Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry.* 18(4): 813-835.
- Dagleish, D. (1993). Bovine milk protein properties and the manufacturing quality of milk. *Livestock production science.* 35(1): 75-93.

- Damodaran, S., Parkin, K. y Fennema, O. (2008). *Fennema's Food Chemistry*. 4 ed., Taylor & Francis Florida, USA.
- Darros, R. (2003). *High pressure and temperature dependence of thermodynamic properties of model food solutions obtained from in situ ultrasonic measurements* (Tesis Doctoral), University of Florida, USA.
- De Kruif, C. G., Huppertz, T., Urban, V. S. y Petukhov, A. V. (2012). Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*. 171: 36-52.
- De Rham, O. y Chanton, S. (1984). Role of ionic environment in insolubilization of whey protein during heat treatment of whey products. *Journal of Dairy Science*. 67(5): 939-949.
- De Wit, J. (1990). Thermal stability and functionality of whey proteins. *Journal of Dairy Science*. 73(12): 3602-3612.
- De Wit, J. (2009). Thermal behaviour of bovine β -lactoglobulin at temperatures up to 150 C. A review. *Trends in Food Science & Technology*. 20(1): 27-34.
- Dissanayake, M. (2011). *Modulation of functional properties of whey proteins by microparticulation* (Tesis Doctoral). Victoria University, Nueva Zelanda.
- Dissanayake, M. y Vasiljevic, T. (2009). Functional properties of whey proteins affected by heat treatment and hydrodynamic high-pressure shearing. *Journal of Dairy Science*. 92(4): 1387-1397.
- Ertugay, M. F., ŞENGÜL, M. y ŞENGÜL, M. (2004). Effect of ultrasound treatment on milk homogenisation and particle size distribution of fat. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 28(2): 303-308.
- Feng, H., Barbosa-Cánovas, G. y Weiss, J. (2011). *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Springer, New York, USA.
- Fitzsimons, S. M., Mulvihill, D. M. y Morris, E. R. (2007). Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. *Food hydrocolloids*. 21(4): 638-644.

- Foegeding, E. A., Davis, J. P., Doucet, D. y McGuffey, M. K. (2002). Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*. 13(5): 151-159.
- Fox, P. y Kelly, A. (2006). Chemistry and biochemistry of milk constituents. *Food Biochemistry and Food Processing*: 425-452.
- Fox, P. F., McSweeney, P. L., Uniacke-Lowe, T. y O'Mahony, J. A. (2015). *Dairy chemistry and biochemistry*. 2a Edición, Springer, Switzerland.
- Frydenberg, R. P., Hammershøj, M., Andersen, U., Greve, M. T. y Wiking, L. (2016). Protein denaturation of whey protein isolates (WPIs) induced by high intensity ultrasound during heat gelation. *Food chemistry*. 192: 415-423.
- Gallegos, A. (2015). *Efectos del pretratamiento de termosonicación en la elaboración y maduración de queso chihuahua*. Benémerita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- Havea, P., Singh, H., Creamer, L. K. y Campanella, O. H. (1998). Electrophoretic characterization of the protein products formed during heat treatment of whey protein concentrate solutions. *Journal of Dairy Research*. 65(01): 79-91.
- Hernández-Rojas, M. y Vélez-Ruíz, J. (2014). Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. *U. d. Américas, Programa de Maestría en Ciencia de Alimentos*: 13-22.
- Hinrichs, J. y Rademacher, B. (2004). High pressure thermal denaturation kinetics of whey proteins. *Journal of dairy research*. 71(04): 480-488.
- ISO y IDF. (2005). Determination of Acid Soluble [Beta]-lactoglobulin Content: Reversed-phase HPLC Method. 1a. ed. ISO/IDF, Geneva (Switzerland).
- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Herceg, Z. y Herceg, I. L. (2008). Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*. 86(2): 281-287.
- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Paniwnyk, L. y Herceg, Z. (2014). Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. *Journal of Food engineering*. 121: 15-23.

Jelen, P. (2003). Whey processing. Utilisation and products *in* Encyclopedia of Dairy Science, 4, H. Roginski, J. W. Fuquay and P. Fox, Eds. Academic Press.

Johnson, B. (2004). *Los concentrados de proteína de suero y sus aplicaciones en productos bajos en grasa*. Alfa Editores Técnicos., México.

Klemaszewski, J. L. y Kinsella, J. E. (1991). Sulfitolysis of whey proteins: effects on emulsion properties. *Journal of agricultural and food chemistry*. 39(6): 1033-1036.

Krešić, G., Lelas, V., Jambrak, A. R., Herceg, Z. y Brnčić, S. R. (2008). Influence of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins. *Journal of Food Engineering*. 87(1): 64-73.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*. 227: 680-685.

Lee, S. Y., Morr, C. V. y Ha, E. Y. (1992). Structural and functional properties of caseinate and whey protein isolate as affected by temperature and pH. *Journal of food science*. 57(5): 1210-1229.

Liu, H., Chen, W. y Mao, S. (2007). Antioxidant nature of bovine milk β -lactoglobulin. *Journal of dairy science*. 90(2): 547-555.

Lupano, C. E. (2007). *Functional Properties Of Food Components*. Research Signpost. pp. 33-53.

Lupano, C. E., Dumay, E. y Cheftel, J. C. (1992). Gelling properties of whey protein isolate: influence of calcium removal by dialysis or diafiltration at acid or neutral pH. *International journal of food science & technology*. 27(6): 615-628.

Marquardt, R. F., Pederson, H. T. y Francis, L. H. (1985). Modified whey product and process including ultrafiltration and demineralization. U.S. Patent No. 4497836 A. U.S. Patent and Trademark Office.

Marshall, K. R. y Harper, W. J. (1988). Whey protein concentrates. *Bulletin of the International Dairy Federation*. 233: 22-32.

Mason, T., Riera, E., Vercet, A. y Lopez-Buesa, P. (2005). Chapter 13 “Applications of Ultrasound” of *Emerging Technologies for Food Processing*, ed Da-Wen Sun, 323-352, Elsevier.

Mizuno, R. y Lucey, J. (2007). Properties of milk protein gels formed by phosphates. *Journal of dairy science*. 90(10): 4524-4531.

Monahan, F. J., McClements, D. J. y Kinsella, J. E. (1993). Polymerization of whey proteins in whey protein-stabilized emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41(11): 1826-1829.

Morr, C. y Foegeding, E. (1990). Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: A status report. *Food Technology*. 44(4).

Morr, C. y Ha, E. (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*. 33(6): 431-476.

Mulet, A., Cárcel, J., Benedito, J. y Sanjuan, N. (2002). *Applications of low-intensity ultrasonics in the dairy industry in Engineering and food for the 21st Century*. CRC, Florida, USA.

Nassar, G., Lefbvre, F., Skaf, A., Carlier, J., Nongaillard, B. y Noël, Y. (2010). Ultrasonic and acoustic investigation of cheese matrix at the beginning and the end of ripening period. *Journal of food engineering*. 96(1): 1-13.

Onwulata, C. y Tomasula, P. (2004). Whey texturization: A way forward. *Food technology*. 58(7): 50-55.

Parra, R. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. Lactosuero; Aplicaciones; Alimento; Proteína; Fermentación. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 62(1): 4967-4982.

Patel, H. A., Singh, H., Havea, P., Considine, T. y Creamer, L. K. (2005). Pressure-induced unfolding and aggregation of the proteins in whey protein concentrate solutions. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53(24): 9590-9601.

Phillips, G. y Williams, P. (1995). Interaction of hydrocolloids in food systems. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*: 131-131.

- Poveda, E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista chilena de nutrición*. 40(4): 397-403.
- Resch, J., Daubert, C. y OEGEDING, A. (2005). β -Lactoglobulin Gelation and Modification: Effect of Selected Acidulants and Heating Conditions.
- Revilla, A. (1982). *Tecnología de la leche: Procesamiento, manufactura y análisis*. IICA, San José, Costa Rica.
- Singh, H. y Havea, P. (2003). Thermal denaturation, aggregation and gelation of whey proteins. *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*, Springer. 1261-1287.
- Singh, R. y Heldman, D. (2001). Introduction to Food Engineering. San Diego. Cal.: Academic Press.
- Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins—from ‘gutter-to-gold’. *International Dairy Journal*. 18(7): 695-704.
- Swaigood, H. (2003). Chemistry of the caseins. *Advanced dairy chemistry—1 Proteins*, Springer. New York, USA. 139-201.
- Tan, M. C., Chin, N. L., Yusof, Y. A., Taip, F. S. y Abdullah, J. (2015). Characterisation of improved foam aeration and rheological properties of ultrasonically treated whey protein suspension. *International Dairy Journal*. 43: 7-14.
- Thompson, A., Boland, M. y Singh, H. (2009). *Milk Proteins From Expression to Food*. Elsevier, New York, USA.
- Torkamani, A. E., Juliano, P., Ajlouni, S. y Singh, T. K. (2014). Impact of ultrasound treatment on lipid oxidation of Cheddar cheese whey. *Ultrasonics sonochemistry*. 21(3): 951-957.
- Villamiel, M., Van Hamersveld, E. y De Jong, P. (1999). Effect of ultrasound processing on the quality of dairy products. *Milchwissenschaft*. 54(2): 69-73.
- Walstra, P., Wouters, J. y Geurts, T. (2005). *Dairy Science and Technology*. 2a Ed., Taylor & Francis, Florida, USA.

Weiss, J., Farriols, G. y Liao, W. (2000). Rheological study of fermentation of ultrasonically homogenized whey proteins emulsions. 5th International Food Hydrocolloids Conference Raleigh, NC, USA.

Weiss, J., Kristbergsson, K. y Kjartansson, G. T. (2011). Engineering food ingredients with high-intensity ultrasound. *Ultrasound technologies for food and bioprocessing*, Springer. 239-285.

Yasui, K. (2002). Influence of ultrasonic frequency on multibubble sonoluminescence. *The Journal of the Acoustical Society of America*. 112(4): 1405-1413.

Young, F. (1989). *Cavitation*. Mc Graw Hill, Gran Bretaña.

Zayas, J. (1996). *Functionality of proteins in food*. Springer, New York, USA.

Zheng, L. y Sun, D.-W. (2006). Innovative applications of power ultrasound during food freezing processes—a review. *Trends in Food Science & Technology*. 17(1): 16-23.

Zisu, B., Bhaskaracharya, R., Kentish, S. y Ashokkumar, M. (2010). Ultrasonic processing of dairy systems in large scale reactors. *Ultrasonics Sonochemistry*. 17(6): 1075-1081.

Anexos

Anexo 1. Determinación de potencia real efectiva por calorimetría

Para calcular la potencia real efectiva aplicada a dispersiones de WPC 80 en las concentraciones de 15 y 20% primero se obtuvo el C_p de cada componente con las ecuaciones que se encuentran en la sección 2.2, los resultados se muestran en la Tabla A1.1.

	15% (p/v)	20% (p/v)
Proteína	2.0082	2.0082
Grasa	1.9842	1.9842
Carbohidratos	1.5488	1.5488
Cenizas	1.0926	1.0926
Agua	4.1762	4.1762

Posteriormente, se sustituyen los resultados en la Ec. 2, obteniendo la capacidad específica para cada concentración; estos últimos se sustituyen en la Ec. 1 para así obtener la potencia real efectiva para cada concentración (Tabla A1.2).

	C_p (kJ/kg °C)	P_n (W)
15% (p/v)	3.8861	88.5044
20% (p/v)	3.7838	89.4525

Anexo 2. Elaboración de curva de calibración de β -LG

Para poder obtener el % de desnaturalización de β -LG, primero se obtuvo la concentración de las mismas en ppm a través de dos curvas de calibración, una correspondiente a la β -Lactoglobulina A (β LG-A) y otra para β -Lactoglobulina B (β LG-B). Dichas curvas se realizaron usando β -Lactoglobulina pura (Sigma-Aldrich, EUA) elaborando 10 soluciones a diferentes concentraciones (500-5000 ppm en intervalos de 500 ppm). Se obtuvo una relación de concentración (ppm) contra el área bajo la curva obtenida en los cromatogramas de cada solución, tanto para β LG-A como para β LG-B como se muestra en la Tabla A2.1.

Tabla A2.1. Áreas bajo la curva obtenidas a diferentes concentraciones de β -LG pura

Ppm	βLG-A	βLG-B
5000	19009.00	18396.60
4500	14671.00	14789.00
4000	12501.40	12552.80
3500	12034.00	11904.30
3000	9197.50	9333.00
2500	7657.60	7944.80
2000	6009.80	5962.50
1500	4388.90	4481.40
1000	2474.90	2499.30
500	660.80	678.50

Posteriormente se graficaron dichas relaciones utilizando el programa OriginPro 8, obteniendo dos gráficas lineales las cuales se muestran en la Figura A2.1. A partir de las mismas se logró cuantificar la proteína sérica desnaturalizada en ppm.

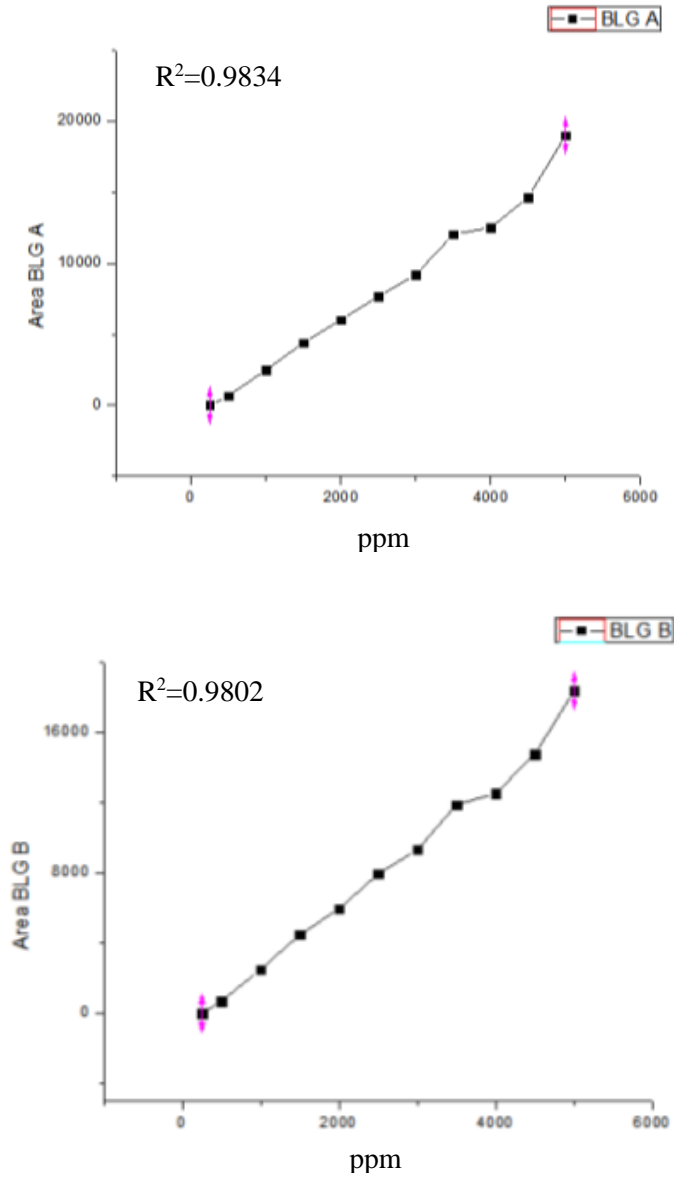


Figura A2.1. Curvas de calibración β LG-A y β LG-B

Una vez obtenida la concentración en ppm de β LG-A y β LG-B, para calcular el % de proteína desnaturalizada se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ proteína desnaturalizada} = 100 - \left(\frac{\text{concentración muestra tratada (ppm)}}{\text{concentración control (ppm)}} * 100 \right)$$

Anexo 3. Análisis de datos de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y firmeza de gel mediante regresión polinomial cuadrática.

El análisis de datos se realizó en el programa Excel 2013, en el cual se utilizó la herramienta de análisis de regresión. Para los resultados de HPLC, los valores obtenidos de la regresión se muestran en la Tabla A3.1.

Tabla A3.1. Valores de regresión obtenidos para HPLC		
	<i>Coefficientes</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepción	9374.5523	0.0000
X1*	-452.2995	0.0010
X2*	-385.0685	0.0210
X3*	1273.7755	0.0000
X1X2	-289.9938	0.0676
X1X3	-292.5229	0.0648
X2X3	-71.1376	0.6289
X1X2X3	-87.2182	0.5545
X2 ² *	676.3569	0.0173

X1: temperatura del tratamiento; X2: tiempo de sonicación; X3: concentración de la dispersión; X1X2: interacción temperatura-tiempo de sonicación; X1X3: interacción temperatura-concentración de la dispersión; X2X3: interacción tiempo-concentración; X1X2X3: interacción temperatura-tiempo-concentración; X2²: tiempo de sonicación elevado al cuadrado por tener más de dos niveles. * indica diferencia significativa p <0.05

En la Tabla A3.2 se muestran los resultados del análisis de regresión para los datos de firmeza de gel.

Tabla A3.2. Valores de regresión obtenidos para firmeza de gel		
	<i>Coefficientes</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepción	6.9739	0.0000
X1*	0.3000	0.0030
X2	-0.0443	0.6998
X3*	0.4570	0.0001
X1X2	-0.0116	0.9188
X1X3*	0.0289	0.0014
X2X3	-0.0357	0.7557
X1X2X3	-0.0803	0.4879
X2 ² *	-0.6726	0.0044

X1: temperatura del tratamiento; X2: tiempo de sonicación; X3: concentración de la dispersión; X1X2: interacción temperatura-tiempo de sonicación; X1X3: interacción temperatura-concentración de la dispersión; X2X3: interacción tiempo-concentración; X1X2X3: interacción temperatura-tiempo-concentración; X2²: tiempo de sonicación elevado al cuadrado por tener más de dos niveles. * indica diferencia significativa p <0.05

Anexo 4. Análisis de superficies de respuesta con respecto a FG

Tabla A4.1 Firmeza de gel modelo obtenida mediante el análisis de regresión del modelo polinomial

T	t	C	Y	ln(y) experimental	x1	x2	x3	x1x2	x1x3	x2x3	x1x2x3	x2^2	ln(y) modelo
50	7	20	709.2000	6.5641	-1.0000	-1.0000	1.0000	1.0000	-1.0000	-1.0000	1.0000	1.0000	6.8623
50	10	20	1480.8300	7.3004	-1.0000	-0.5714	1.0000	0.5714	-1.0000	-0.5714	0.5714	0.3265	7.1132
50	14	20	1783.2000	7.4862	-1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	-1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	7.1489
50	17	20	982.7300	6.8903	-1.0000	0.4286	1.0000	-0.4286	-1.0000	0.4286	-0.4286	0.1837	6.9517
50	21	20	505.2300	6.2250	-1.0000	1.0000	1.0000	-1.0000	-1.0000	1.0000	-1.0000	1.0000	6.3900
60	7	20	1254.5200	7.1345	1.0000	-1.0000	1.0000	-1.0000	1.0000	-1.0000	-1.0000	1.0000	7.1581
60	10	20	1673.7600	7.4228	1.0000	-0.5714	1.0000	-0.5714	1.0000	-0.5714	-0.5714	0.3265	7.4725
60	14	20	2005.1000	7.6034	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	7.5930
60	17	20	2122.5000	7.6603	1.0000	0.4286	1.0000	0.4286	1.0000	0.4286	0.4286	0.1837	7.4594
60	21	20	938.6400	6.8444	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	6.9825
50	7	15	388.1000	5.9613	-1.0000	-1.0000	-1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	-1.0000	1.0000	5.7231
50	10	15	304.3500	5.7182	-1.0000	-0.5714	-1.0000	0.5714	1.0000	0.5714	-0.5714	0.3265	6.0429
50	14	15	426.4000	6.0554	-1.0000	0.0000	-1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	6.1707
50	17	15	546.6750	6.3039	-1.0000	0.4286	-1.0000	-0.4286	1.0000	-0.4286	0.4286	0.1837	6.0425
50	21	15	247.9750	5.5133	-1.0000	1.0000	-1.0000	-1.0000	1.0000	-1.0000	1.0000	1.0000	5.5728
60	7	15	593.8500	6.3866	1.0000	-1.0000	-1.0000	-1.0000	-1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	6.1278
60	10	15	596.1000	6.3904	1.0000	-0.5714	-1.0000	-0.5714	-1.0000	0.5714	0.5714	0.3265	6.5065
60	14	15	617.0000	6.4249	1.0000	0.0000	-1.0000	0.0000	-1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	6.7128
60	17	15	706.8000	6.5607	1.0000	0.4286	-1.0000	0.4286	-1.0000	-0.4286	-0.4286	0.1837	6.6434
60	21	15	652.1000	6.4802	1.0000	1.0000	-1.0000	1.0000	-1.0000	-1.0000	-1.0000	1.0000	6.2523

T: Temperatura de sonicación; t: tiempo de sonicación; C: concentración de la dispersión; y: resultados experimentales de FG; ln(y) experimental: Logaritmo natural de resultados experimentales de FG; x1: Temperatura de sonicación (-1 nivel bajo 50°C, 1 nivel alto 60°C); x2: tiempo de sonicación (se ocupa la fórmula (nivel a analizar- 14 min)/7 min); x3: concentración de dispersiones (-1 nivel bajo 15%, 1 nivel alto 20%). x1x2: interacción temperatura-tiempo de sonicación; x1x3: interacción temperatura-concentración de la dispersión; x2x3: interacción tiempo-concentración; x1x2x3: interacción temperatura-tiempo-concentración; x2²: tiempo de sonicación elevado al cuadrado por tener más de dos niveles; ln(y) modelo: Logaritmo natural de resultados obtenidos del modelo polinomial de FG.