

# Influencia de los Cambios Estructurales de la Beta-lactoglobulina Glicosilada con Xilosa sobre las Propiedades Estructurales en Medio Ácido

**Resumen:** La beta-lactoglobulina (proteína principal del suero de leche bovina) puede ser conjugada con carbohidratos reductores a través de la reacción de Maillard dando como resultado compuestos glicosilados de beta-lactoglobulina. El objetivo de este trabajo fue estudiar la estabilidad de las emulsiones obtenidas a partir de la beta-lactoglobulina glicosilada con Xilosa a pH 5, 6 y 7 ya que en este rango de pH se encuentran la mayoría de los alimentos procesados. La reacción de Maillard se llevó a cabo a 50°C, con humedad relativa de 65% durante 80h usando una mezcla de beta-lactoglobulina-Xilosa (relación molar 1/100). La cantidad de grupos aminos libres fue de 10%. La cromatografía de exclusión molecular mostró deformación del pico de beta-lactoglobulina glicosilada hacia compuestos de mayor peso molecular, respecto del pico de la beta-lactoglobulina sin conjugar. La emulsión más estable se obtuvo a pH 6, esto se determinó por medidas turbidimétricas durante 24 horas, mostrando la menor la turbidez al final del tiempo de ensayo.

**Palabras Claves:** Beta-lactoglobulina; Reacción de Maillard; Emulsiones; Xilosa.

**Abstract:** Beta-lactoglobulin (bovine milk whey main protein) can be conjugated to reducing carbohydrates through the Maillard reaction resulting in glycosylated beta-lactoglobulin compounds. The objective of this work was to study the stability of the emulsions obtained from the beta-lactoglobulin glycosylated with Xylose at pH 5, 6 and 7 since in this pH range most processed foods are found. The Maillard reaction was carried out at 50 ° C, at 65% relative humidity for 80h using a mixture of beta-lactoglobulin-Xylose (1/100 molar ratio). The amount of free amine groups was 10%. Molecular exclusion chromatography showed deformation of the glycosylated beta-lactoglobulin peak toward compounds of higher molecular weight, relative to the unconjugated beta-lactoglobulin peak. The most stable emulsion was obtained at pH 6, this was determined by turbidimetric measurements for 24 hours, showing the lowest turbidity at the end of the test time.

**Keywords:** Beta-lactoglobulin; Maillard reaction; Emulsions; Xylose.

Fátima B. García<sup>1</sup>, Jimena Ciz<sup>2</sup>, Milagros B. Rubio Bonnet<sup>3</sup>

Mail: <sup>1</sup>fatgarcia@frro.utn.edu.ar - <sup>2</sup>jciz@frro.utn.edu.ar - <sup>3</sup>mrubiobonne@frro.utn.edu.ar

## INTRODUCCIÓN

Una emulsión es una dispersión de dos líquidos no miscibles, resultando una fase continua y una fase dispersa en forma de gotas o glóbulos. Es un sistema termodinámicamente inestable debido a la elevada área interfacial creada, acompañada por una alta tensión interfacial, lo cual aumenta la energía libre del sistema (Wagner et al., 2000). En los alimentos estas fases son generalmente una fase acuosa y una lipídica, siendo esta última fase la que se encuentra dispersa en la mayoría de los casos. Con el propósito de analizar la estabilidad de las emulsiones para mejorar su uso en la alimentación se pueden investigar los tratamientos previos de los agentes emulsificantes y las condiciones de formación y almacenamiento (Moro et al., 2013).

La estabilidad de una emulsión está determinada por distintos factores: la distribución del tamaño de gota (entre 0,1-100 micrómetros en las emulsiones alimenticias), la viscosidad de la fase continua, la temperatura, la diferencia de densidad entre fases, la relación volumétrica entre fases, las propiedades de la película interfacial y el trabajo mecánico (agitación, batido, etc.) al que se somete la emulsión.

Las proteínas son buenos agentes emulsificantes ya que, debido a su naturaleza anfifílica poseen acción tensioactiva, y por su tendencia a desnaturalizarse y agregarse en interfaces, forman películas de rigidez y elasticidad variables.

Los mecanismos físicos que contribuyen a la desestabilización de una emulsión son: procesos gravitacionales (cremado o sedimentación), floculación, coalescencia de las gotas, maduración de Ostwald e inversión de fase (McClements, 1999).

El líquido remanente después de la precipitación isoeléctrica de caseínas, el suero de la leche, es una solución diluida de proteínas (aproximadamente 0,7% en leche bovina), lactosa, sales, vitaminas y varios

constituyentes a niveles de trazas (Thompson, 2008). La  $\beta$ -LG constituye alrededor del 50% de la fracción proteica del lactosuero (Creamer y Sawyer, 2003). Esta proteína además de estar presente en la leche de vaca se encuentra en la leche de la mayoría de los mamíferos, excepto roedores y humanos (Kontopidis, 2004).

A fin de estudiar las modificaciones de la estructura y la funcionalidad de las proteínas se ha prestado especial atención a los efectos que ejercen los azúcares reductores sobre éstas. Existiendo actualmente evidencias suficientes de que el calentamiento controlado de las proteínas con azúcares reductores de diferente peso molecular para formar glicoconjugados vía reacción de Maillard, es uno de los métodos más efectivos para obtener nuevas proteínas modificadas con gran interés tecnológico (Oliver y col., 2006). Esta reacción consiste en una condensación del azúcar reductor con el grupo  $\epsilon$ -amino de los residuos lisina de las proteínas a través de la formación de iminas (base de Schiff) y el posterior reordenamiento de Amadori. Además la glicosilación o pardeamiento no enzimático no implica el uso de reactivos que puedan resultar tóxicos para el consumo humano, siendo, quizás el método más seguro para mejorar las propiedades funcionales de las proteínas con fines alimentarios.

El objetivo del presente trabajo fue analizar la estabilidad de las emulsiones, obtenidas a partir de soluciones de  $\beta$ -LG glicosilada con xilosa ( $\beta$ -LG-XI) a pH 5, 6 y 7 siendo éste el rango de acidez en el cual se encuentran la mayoría de los alimentos procesados. Este azúcar, la xilosa, es una aldopentosa, un monosacárido que contiene cinco átomos de carbono y que contiene un grupo funcional aldehído, cuyo isómero funcional que es la xilulosa. Es uno de los ocho azúcares esenciales para la nutrición humana. Se realizó el seguimiento de

la reacción de Maillard por medida de absorbancia. Los grupos aminos libres se estimaron mediante método colorimétrico. La extensión de la agregación proteica se estudió a través de cromatografía de exclusión molecular (SE-HPLC) y la estabilidad de las emulsiones mediante medidas turbidimétricas.

## METODOLOGÍA

Se mezcló,  $\beta$ -LG y Xilosa (Xi) en relación molar 1/100. Se disolvió la mezcla en buffer fosfato 50 mM, pH 6,8 (concentración de  $\beta$ -LG 2,5% P/V), (Moro, et al, 2011) y posteriormente se liofilizó. La muestra obtenida se llevó a estufa a 50 °C, humedad relativa de 65 % (solución saturada de IK) durante 80 h. (Medrano et al, 2012). Como muestra control se usó  $\beta$ -LG a igual concentración que la de la proteína glicosilada pero sin el agregado de la pentosa y se efectuó el mismo tratamiento. Se prepararon soluciones acuosas (1mg/ml) de las muestras en incubación y se leyó absorbancia a 420 nm (espectrofotómetro Jasco V-550. Japón) para observar el pardeamiento (Cheetangdee et al., 2014). Transcurrido el tiempo de incubación, el polvo se disolvió, se eliminó el exceso de Xi mediante diálisis y se liofilizó. Las muestras liofilizadas fueron redisueltas en buffer fosfato 50 mM pH 6,8 manteniendo la concentración inicial de  $\beta$ -LG. Para determinar la cantidad de grupos amino libres remanentes se utilizó el método colorimétrico basado en la reacción de O-ftaldialdehído (OPA). El ensayo consistió en mezclar 3 mL de reactivo OPA con 50  $\mu$ L de solución de proteína (10 mg mL<sup>-1</sup>), incubar 30 min a temperatura ambiente y luego medir absorbancia a 340 nm. Para la confección de la curva de calibración se empleó L-leucina como

estándar. (Wooster, et al., 2007). Para investigar la distribución de tamaño hidrodinámico de los conjugados  $\beta$ -LG-Xi se utilizó cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Mediante un equipo Shimadzu LC-20, Japón, equipado con detector UV-visible y software Clarity (Data Apex) se realizó cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Bio Sep SEC-3000, Phenomenex con rango de separación para péptidos y proteínas de 5 a 700 kDa. Como fase móvil se utilizó buffer fosfato 100 mM, pH 6,8 con agregado de 100 mM de ClNa, detector UV ( $\lambda$  igual a 280 nm), caudal 0,8 mL/min, 25 °C, volumen de inyección de 20  $\mu$ L. Las emulsiones se prepararon por homogeneización mecánica de alta velocidad (Omni Mixer, International, USA) de 3 mL de las muestras acuosas del sustrato proteico ( $\beta$ LG-Xi o  $\beta$ -LG control) de una concentración de 0,5% (P/V) en buffer fosfato 50 mM del pH que corresponda de acuerdo al protocolo de trabajo con 1 mL de aceite de maíz comercial, (f = 0,25) a 20000 rpm durante 60 seg. (Moro el al, 2011, 2013; Ballerini, tesis doctoral, 2011). Para medir la estabilidad de las emulsiones al cremado, estas fueron preparadas en tubos transparentes de 15 ml con su parte inferior troncocónica adaptada para extracción de muestra con una jeringa Hamilton. Durante 24 h se extrajeron, de cada tubo y por triplicado, a diferentes tiempos, 20  $\mu$ L de emulsión que se diluyeron a 5 ml con solución estabilizadora (0,1 % P/V de SDS, ClNa 100 mM, buffer fosfato 100 mM, pH 7). Cada tubo con la muestra de emulsión estabilizada fue convenientemente agitado antes de determinar su turbidez por lectura de absorbancia a 500 nm contra blanco de solución estabilizadora. La cinética de cremado que presentó menor pendiente en 24h fue la emulsión más estable. (Ballerini, 2011).

## RESULTADOS

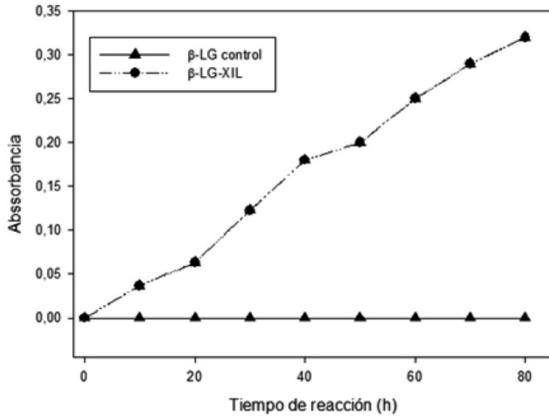


Fig. 1: Desarrollo de color marrón por medida de absorbancia a 420 nm.

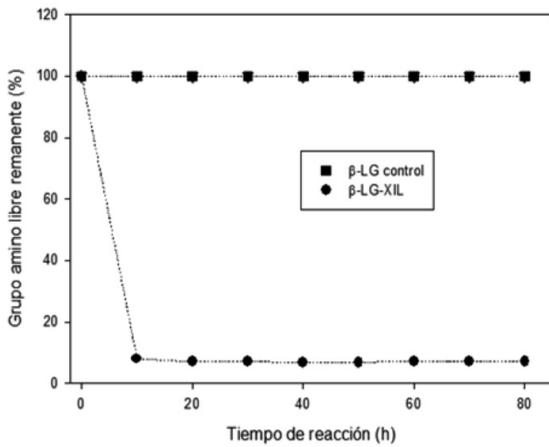


Fig. 2: Grupos amino libres remanentes por medida colorimétrica (OPA).

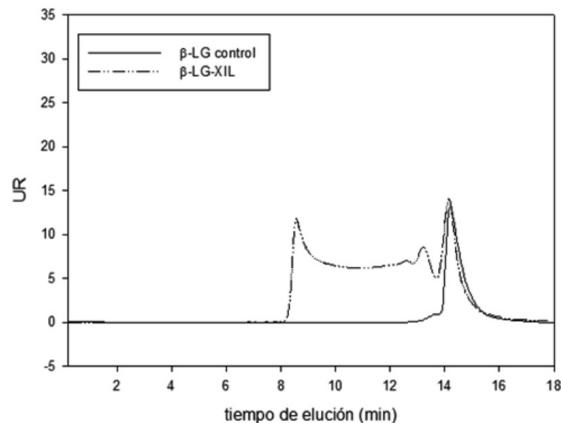


Fig. 3: Superposición de cromatogramas de exclusión molecular.

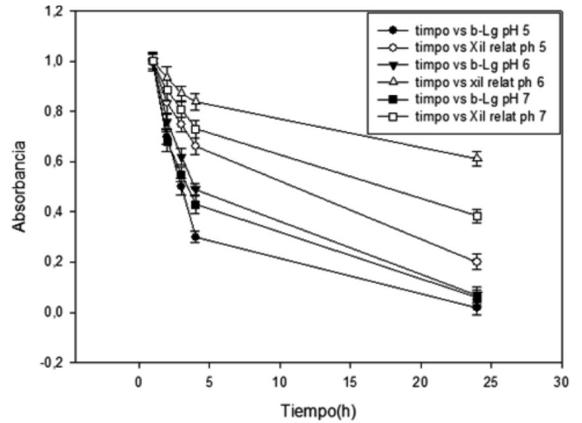


Fig. 4: Estabilidad relativa de emulsiones.

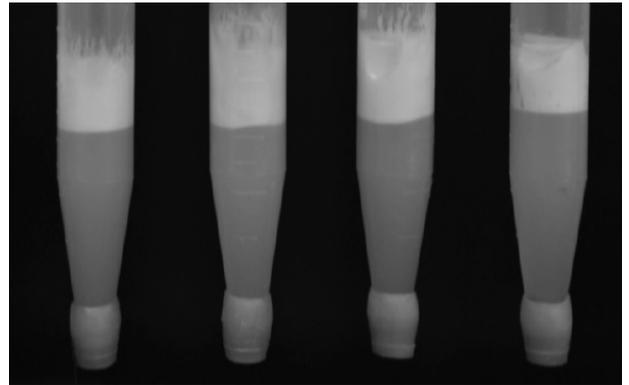


Fig. 5: Fotografías tomadas 24 h después de preparadas las emulsiones. De izquierda a derecha:

- βLG control pH 5
- βLG-XI pH 5
- βLG control pH 6
- βLG-XI pH 6
- βLG control pH 7
- βLG-XI pH 7

## DISCUSIÓN

Se siguió el avance la reacción de Maillard a través del desarrollo del color marrón (Figura 1). En esta figura se representa el curso temporal de pardeamiento en función del tiempo de calentamiento. Se observa que la β-LG -Xi desarrolla lentamente su color característico y pasadas las 20hs el incremento de la tonalidad aumenta

de manera acelerada, mientras que la  $\beta$ -LG control no desarrolló color marrón durante todo el tiempo de la experiencia. Estos resultados coinciden con las investigaciones de Larroque et al., 2008. Por otra parte se examinó la disminución de los grupos aminos libres (Figura 2). Para la  $\beta$ -LG glicosilada con Xilosa el decrecimiento abrupto de la curva de la disminución de los grupos aminos libres se debe al consumo de estos dentro de las 10 primeras horas de tratamiento posteriormente seguido de un estado de equilibrio, mientras que para la muestra control la cantidad promedio de grupos aminos libres permaneció constante. Esto mostró que la Xilosa se conjuga rápida y efectivamente a la  $\beta$ -LG.

De los resultados obtenidos en la cromatografía de exclusión molecular (SE-HPLC) en la muestra control se observa una deformación a los 13.5 min de tiempo de elución debido al pequeño porcentaje de dímero de la  $\beta$ -LG, idéntico al que aparece en los cromatogramas de la  $\beta$ -LG sin tratar (dato no mostrado). Esto confirma que no se afecta la estructura de la  $\beta$ -LG cuando se la somete a la reacción de Maillard y avala los resultados mostrados en la figura 2.

En el cromatograma de la figura 3 se observa un marcado aumento de la altura del pico a los 7.9 min de tiempo de elución correspondiente a la formación de trímeros y oligómeros, que no están presentes en la muestra control. Además aumenta considerablemente la altura del pico a los 13.5 min, es decir aumenta el porcentaje de moléculas diméricas. A su vez se observa una marcada disminución de la altura de pico correspondiente a la  $\beta$ -LG (Cheetangdee et al., 2014; Moro, et al, 2013; Wooster et al., 2007).

Estos resultados evidencian que la conjugación de la  $\beta$ -LG con Xilosa permite la formación de uniones inter e intra moleculares (Moro, et al.,2011) y comparando las figuras 2 y 3 podemos afirmar que la disminución

de grupos aminos libres es más elevada en comparación con la glicosilación de la misma proteína con otros azúcares reductores, (Larroque et al., 2008) los pesos moleculares de los productos obtenidos en esta glicosilación son lo suficientemente elevados como para producir fuerte impedimento estérico y/o disminución acentuada del desplazamiento de la proteína glicosilada hacia la interface cuando se esté evaluando sus propiedades superficiales de emulsificación (Moro, et al., 2013).

Para el estudio de la estabilidad emulsionante se debe tener en cuenta que el principal proceso de desestabilización en condiciones de reposo es la formación de crema, en que las pequeñas gotas de aceite comienzan a migrar con el tiempo desde el fondo a la parte superior (Dickinson, 2001).

La figura 4 muestra el resultado del análisis de estabilidad al cremado de las emulsiones ensayadas, este gráfico se complementa con la figura 5, en la cual se observan las fotografías de las emulsiones registradas inmediatamente después de formadas y a las 24 h de reposo. Tanto para las emulsiones obtenidas usando como sustrato proteico  $\beta$ -LG-Xi como para sus homólogas, usando  $\beta$ -LG control, preparadas a pH entre 5 y 7, se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en los valores de absorbancia relativa a 500 nm. Por lo tanto no existe solapamiento entre los intervalos de confianza de éstas con sus homólogas a los otros pH investigados

Las emulsiones de  $\beta$ -LG-Xi obtenidas a pH6, parecieran ser las más estables y muestran la menor disminución de absorbancia en el tiempo ensayado. En lo que se refiere a estabilidad de la emulsión, los conjugados de  $\beta$ -LG-polisacáridos previenen efectivamente la agregación entre gotas de aceite más que la  $\beta$ -LG control. Medrano, et al., 2012; Dickinson, 1991, 2001, estudiaron las propiedades emulsificantes de emulsiones prepa-

radas usando  $\beta$ -LG glicosilada con Xilosa, entre otros azúcares, a pH comprendido entre 3 y 9. Probaron que la tensión interfacial entre los distintos compuestos glicosilados y las muestras control fue comparable. La tensión interfacial alcanzó los valores más bajos para pH cercano al punto isoeléctrico (PI) de la  $\beta$ -LG (pH 4,6 a 5,2) y se incrementó levemente cuando el pH pasó de 6 a 7. Por otra parte los mismos autores probaron que el mayor tamaño de gota en las emulsiones fue obtenido en los alrededores del PI de la  $\beta$ -LG. Basándonos en estas investigaciones y resultados obtenidos por Moro et al., 2013; Dickinson, 2003, 2009; Kumar et al., 1996; Bouyer, et al., 2012; Bouyer, et al., 2013; Damodaran, 2005 entre otros, se podría deducir que, a pesar de la baja tensión interfacial obtenida a los pH trabajados, su variación no es la única causa de la gran diferencia de estabilidad para las emulsiones obtenidas. El tamaño de la gotita influencia negativamente a la estabilidad de las emulsiones ya que de acuerdo a la ley de Stokes la tasa de formación de crema depende del cuadrado del radio de la gota por lo tanto cuanto mayor sea el radio de la gota mayor será la desestabilización de la emulsión (Moro, et al., 2013). A pH 5 se produce la menor estabilidad de las emulsiones debido al mayor tamaño de gota obtenido. Con respecto a emulsiones obtenidas a pH 7, si bien tendrían un tamaño de gota mucho más pequeño que a pH 5, su mayor tensión interfacial las haría menos estables que las obtenidas a pH 6. . En definitiva esta estabilidad mejorada en las emulsiones

obtenidas a pH 6 se debería a la baja tensión interfacial (Capek, 2004, Dickinson 2003) y el suficientemente pequeño tamaño de la gota (Moro et al 2013). Cabe considerar además dos situaciones contrapuestas que coexisten: para el rango de pH comprendido entre 5 y 7 hay escasa exposición de los grupos hidrofóbicos de la  $\beta$ -LG lo que resulta desfavorable para la estabilidad de las emulsiones y la glicosilación no condujo a la formación de compuestos de muy elevado peso molecular lo que es favorable (Ballerini, 2011) pero debido a que la enérgica homogeneización que involucra la emulsificación genera turbulencias que permiten a los agregados alcanzar la interface a través de un transporte de masa convectivo (Dickinson 2009) su pobre flexibilidad y/o su tamaño podrían ser factores responsables de una adhesión inapropiada a la interfase de la gota de aceite resultando así en una pobre estabilidad de las emulsiones.

## CONCLUSIONES

La  $\beta$ -LG y la Xilosa forman de manera rápida conjugados  $\beta$ -LG-Xi con un 10% de grupos aminos libre sin conjugar. Los datos obtenidos por cromatografía demostraron una deformación del pico de la  $\beta$ -LG-Xi hacia compuestos de mayor peso molecular en comparación con la  $\beta$ -LG control, predominando dímeros, trímeros y oligómeros. La mayor estabilidad de las emulsiones se obtuvo a pH 6, siendo más estable la emulsión obtenida con  $\beta$ -LG glicosilada que su homóloga con  $\beta$ -LG control.

## REFERENCIAS

- Ballerini, G. Tesis Doctoral en Ciencias Químicas (2011). Facultad de Ciencias Bioq. y Farm. UNR. Dirección Dr. Delorenzi N.
- Delhine Larroque, Claude Inisan, Céline Berger, Eric Vouland, Lauren Dufossé, Fabienne Guerard (2008). "Estudio cinético de la reacción de Maillard. Exámen de la reactividad del azúcar."
- Belitz, H.D.; Grosch, W.; Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. Springer.
- Bouyer, E.; Mekhloufia, G.; Rosilio, V.; Grossiord, J. L.; Agnelya, F. (2012). "Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field *Int. J. of Pharmaceutics*. 436: 359– 378."
- Bouyer, E.; Mekhloufia, G.; Huang, N.; Rosilio, V.; Agnelya, F. (2013). "β-Lactoglobulin, gum arabic, and xanthan gum for emulsifying sweet almond oil: Formulation and stabilization mechanisms of pharmaceutical emulsions. *Colloids and surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 433:77– 87"
- Capek, I. (2004). Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. *Adv. Colloid Inter-face Sci*. 107: 125–155
- Cheetangdee, N.; FuKada, K. (2014). "Emulsifying activity of bovine βlactoglobuline conjugated with hexoses through the Maillard reaction. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*. 450: 148-155"
- Chevalier, F.; Chobert, J.; Popineau, Y., Nicolas, M.; Haertlé, T. (2001b). "Improvement of functional properties of beta-lactoglobulin glycosylated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar. *International Dairy Journal*. 11: 145-152"
- Damodaran, S. (2005). "Protein stabilization of emulsions and foams. *J. Food Sci*. 70: 54–66."
- Dickinson, E.; Galazka, V. (1991). "Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of beta-lactoglobulin with polysaccharides. *Food Hydrocolloids*. 5(3): 281-296"
- Dickinson, E. (2001). "Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. *Colloids Surf. B: Biointerf*. 15:161-176"
- Dickinson, E. (2003). "Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids* 17:25-39"
- Dickinson, E. (2009). "Hydrocolloids as emulsifiers stabilizers. *Food Hydrocolloids* 23:1473-1482"
- Foegeding, E.; Davis, J.; Doucet, D.; McGuffey, M., (2002). "Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in food science and Technology*, 13 (5), 151-159"
- Herceg, Z., Rezek, A., Lelas, V.; Kresic, G.; Franetovic, M. (2007). "Effect of carbohydrates on the emulsifying, foaming and freezing properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*. 79(1): 279-286."
- Jiménez-Castaño, L., M. Villamiel, M.; López-Fandiño, R. (2007). "Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass. *Food Hydrocolloids*. 21(3): 433-443."
- Kumar, S.; Narsimhan, G.; Ramkrishna, D. (1996). "Coalescence in creaming emulsions. Existence of a pure coalescence zone. *Industrial and Engineering Chemical Research*. 35(9):3155-3162"
- MCClements, D. J. (1999). "Food Emulsion principles, practice y technique. New York: CRC Pres (Charper 7) "